

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Barbora Kodedová

In vitro testování buněčných nosičů na bázi nanovláken pro léčbu vitiliga

In vitro testing of carrier system based on nanofibres for vitiligo treatment

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Evžen Amler CSc.

Praha 2016

Poděkování

Chtěla bych poděkovat celé laboratoři tkáňového inženýrství ÚEM za trpělivost, kterou se mnou měli při zaučování v laboratoři. Dále za neocenitelnou pomoc a neustále odpovídání na mé dotazy při seznamování se s novými metodami a prací s buněčnými kulturami. Můj dík patří i mým skvělým přátelům Kláře Steklíkové, Radce Uvizlové, Jakubovi Strakovi a Zdeňkovi Jandákovi, bez jejichž podpory bych v době, kdy se nic nedařilo, tuto diplomovou práci i dokončení magisterského studia pravděpodobně vzdala. Velký dík Miri a Martinovi Volfovým, u kterých jsem měla často svou diplomkovou kancelář a poradnu.

Projekt byl financován z grantu GA UK č. 1228214.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Nemám žádný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Praze dne

Podpis

Obsah

Abstrakt	7
Abstract	8
Seznam zkratek.....	9
1 Úvod.....	11
2 Přehled literatury	12
2.1 Struktura a fyziologie kůže	12
2.1.1 Vývoj melanocyту	13
2.1.2 Funkce a syntéza melaninu	13
2.1.3 Funkce v organismu.....	14
2.1.4 Syntéza melaninu	14
2.1.5 Faktory ovlivňující tvorbu melaninu.....	16
2.2 Vitiligo	17
2.2.1 Patofyziologie vitiliga.....	18
2.2.2 Současná léčba vitiliga	19
2.2.3 Buněčné nosiče v terapii vitiliga	23
2.3 Nanovlákná v tkáňovém inženýrství.....	24
2.4 Elektrostatické zvlákňování.....	25
2.4.1 Polymery pro zvlákňování.....	26
2.4.2 Polyvinylalkohol (PVA).....	27
2.5 Modifikace nanovláken plazmatem	29
2.5.1 Využití plazmatu v biomedicíně.....	30
2.5.2 Nanovlákná funkcionalizovaná plazmatem	31
3 Cíle práce.....	33
4 Metodika	34
4.1 Materiál a metody	34

4.2	Buněčné kultivace na nosičích.....	35
4.3	Elektrostatické zvlákňování.....	36
4.4	Plazmatická modifikace	37
4.5	Sterilizace nanovláken	38
4.6	Analýza chemie povrchu a struktury nanovláken	38
4.6.1	Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)	38
4.6.2	Rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS).....	38
4.6.3	Smáčivost povrchu nanovláken (kontaktní úhel).....	39
4.6.4	Měření zeta potenciálu povrchu (ζ)	39
4.6.5	Absorpce proteinů (BSA) na nosiče	40
4.7	Buněčné kultivace na nosičích.....	40
4.7.1	Stanovení metabolické aktivity buněk (MTS)	41
4.7.2	Kvantifikace DNA.....	41
4.7.3	Obsah melaninu na nosičích.....	42
4.8	Fluorescenční konfokální mikroskopie	42
4.8.1	Adheze buněk na nosiče.....	42
4.8.2	Vizualizace cytoskeletu	42
4.9	Statistická analýza	43
5	Výsledky.....	44
5.1	Plazmatická modifikace	44
5.2	Analýza chemie povrchu a struktury nanovláken	45
5.2.1	SEM analýza vláken	45
5.2.2	Smáčivost povrchu nanovláken (kontaktní úhel).....	47
5.2.3	Měření Zeta potenciálu (ζ)	48
5.2.4	Rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS).....	49
5.2.5	Absorpce BSA na nanovláčenné nosiče	51
5.3	Buněčné testy	52

5.3.1	Metabolická aktivita buněk (MTS)	52
5.3.2	Kvantifikace DNA	55
5.3.3	Obsah melaninu na PVA nosičích.....	58
5.4	Fluorescenční konfokální mikroskopie	60
5.4.1	Adheze buněk na PVA nanovlákná.....	60
5.4.2	Vizualizace aktinového cytoskeletu.....	62
6	Diskuse	65
7	Závěr	71
8	Seznam literatury	72
8.1	Internetové zdroje	82

Abstrakt

Vitiligo je kožní onemocnění s prevalencí 2 % v celosvětové populaci. Je charakteristické sníženou aktivitou či ztrátou melanocytů v epidermis, vedoucí k depigmentaci v kůži a ve vlasech. Zásadně ovlivňuje psychiku, sociální vztahy pacientů a snižuje schopnost obrany organismu proti UV záření. Jednou z metod léčby je autologní transplantace melanocytů, nebo suspenze melanocytů s keratinocyty. Použití biokompatibilní membrány umožňující kultivaci těchto buněk s jejich následnou transplantací na depigmentované léze by mohlo zvýšit úspěšnost a zefektivnit tuto formu léčby.

Cílem této práce proto bylo vytvořit biokompatibilní membránu z nanovláknenných vrstev polyvinylalkoholu (PVA), která by mohla sloužit jako nosič pro buněčné transplantáty v terapii vitiliga. Nosiče z PVA byly připraveny elektrostatickým zvlákňováním z hladiny a následně modifikovány studeným metanovým (CH_4) plazmatem pro snížení jejich hydrofilnosti. Vzorky modifikovaných nanovláknenných nosičů byly podrobeny analýze fyzikálně-chemických vlastností (vizualizace morfologie vláken pomocí SEM, XPS analýza, smáčivost a Zeta potenciál povrchu). Následně byla sledována adheze, proliferace a metabolická aktivita myších linií melanocytů (Melan-a) a keratinocytů (XB2) pomocí testování *in vitro*.

Z výsledků vyplývá, že krátkodobá modifikace CH_4 plazmatem má pozitivní vliv na buněčnou adhezi, viabilitu i proliferaci melanocytů a keratinocytů. U melanocytů navíc zvyšuje jejich metabolickou aktivitu, což se projevuje zvýšenou melanogenezí. Nejlepších výsledků *in vitro* testů dosahovaly vzorky modifikované po dobu 5 min (PVA3) a 2,5 min (PVA6) při průtoku plynu 5 sccm do plazmatické komory. Výsledky studie ukazují, že takto modifikovaná PVA nanovláknna jsou vhodná pro kultivaci kožních buněk a v budoucnosti by mohla sloužit jako buněčné nosiče například v terapii vitiliga či jiných kožních onemocnění.

Klíčová slova: polyvinylalkohol, plazmatická modifikace, nanovláknna, vitiligo, melanocyty, keratinocyty.

Abstract

Vitiligo is a skin disease with 2 % prevalence in a worldwide population. It is characterised by loss or decrease in activity of epidermal melanocytes, which lead to skin and hair depigmentation. It has negative impact on psyche, social relationships of patients and reduces the protection of the organism against UV radiation. One of the treatment methods is autologous transplantation of melanocytes or suspension of melanocytes with keratinocytes. Use of the biocompatible membrane, which allows the cultivation of these cells with resulting transplantation on the depigmented lesion, could improve treatment and make it more efficient. The main goal of this work was to create the biocompatible membrane from nanofiber layers of polyvinylalcohol (PVA) which can stand as a carrier for cell transplants in vitiligo therapy.

PVA scaffolds were prepared by electrostatic spinning and later on modified by cold methane plasma (CH₄) for lowering their hydrophilicity. Samples of modified nanofiber carriers were analysed according to their physical and chemical characteristics (visualization fiber morphology by SEM, XPS and surface Zeta potential analysis and contact angle). Consequently, adhesion, proliferation and metabolic activity of cultivating mice cell lines of melanocytes (Melan-a) and keratinocytes (XB2) were examined *in vitro*.

Results shows that short term CH₄ plasma treatment has positive impact on adhesion, viability and proliferation of melanocyte and keratinocyte. Plasma modification increases the adhesion of melanocyte to the scaffold which was manifested by increased melanogenesis. Samples modified 5 minutes (PVA3) and 2,5 min (PAV6) with gas flow of 5 sccm in the plasma chamber were demonstrated as the most suitable samples for the cultivation of melanocytes and keratinocytes *in vitro*. Results showed that modified PVA nanofibers are suitable for cultivation of skin cells and have high potential for use in the treatment of vitiligo and other diseases.

Key words: Polyvinylalcohol, Plasma modification, Nanofibers, Vitiligo, Melanocyte, Keratinocyte.

Seznam zkratek

ACTH	z angl. adenocorticotropic hormone, adrenokortikotropní hormon
AN	akrylonitril
BCECF	z angl. 2',7'-bis-(2-karboxyethyl)-5,6-karboxyfluorescein, acetoxymethyl este
bFGF	z anglického basic fibroblast growth factor, bazický fibroblastový růstový faktor
BSA	bovinní sérový albumin
cps	z angl. cycles per second, cyklus za sekundu
CD29	z angl. cluster of differentiation 29, transmembránový glykoprotein
CVD	z angl. chemical vapor deposition, chemická depozice z plynné fáze
DCT	dopachrom tautomeráza
DiOC6(3)	z angl. 3,3'dihexyloxakarbokyanin jodid
DHI	z angl. 5,6-dihydroxyindole
DHICA	z angl. 5,6-dihydroxyindole-2-karboxylová kyselina
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium
DOPA	z angl. 3.4-dihydroxyfenylalanin
EDTA	z angl. ethylenediaminetetraacetic acid
ER	endoplazmatické retikulum
EZ	elektrostatické zvlákňování
FAT	z angl. fixed analyzer transmission, fixovaný analyzer transmise
FDA	z angl. hyaluronic acid Food and Drug Administration, úřad pro kontrolu potravin a léčiv (USA)
GM-CSF	z angl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, granulocyty-makrofágy stimulující faktor
HA	z angl. hyaluronic acid, kyselina hyaluronová
HGF	z angl. hepatocyte growth factor, hepatocytární růstový faktor
HSP70i	z angl. inducible heat-shock protein 70, protein teplotního šoku 70
LIF	z angl. leukemia inhibitory factor, leukemický inhibiční faktor
Melan-a	myší linie melanocytů
MITF	z angl. microphthalmia-associated transcription factor, s mikrooftalmií spojený transkripční faktor
MSH	melanocyty stimulující hormon
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium
NB-UVB	z angl. narrowband ultraviolet B, úzkopásmové ultrafialové záření B
NGF	z angl. nerve grow factor, nervový růstový faktor

NVP	N-viny-2-lpyrolidon
PAN	polyakrilonitril
Pax3	z angl. transcription factor paired box 3, transkripční faktor spárovaný s box 3
PBS	fosfátový pufr
PCL	z angl. poly-ε-caprolakton, polykaprolakton
PGA	z angl. poly(glicolic acid), polyglykolová kyselina
PLA	z angl. poly(lactic acid), polymléčná kyselina
PLCL	z angl. poly(lactic acid-co-caprolactone), kopolymer polymléčné kyseliny a polykaprolaktonu
PLGA	z angl. poly(lacti-co-glycolic acid), kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
PP	polypropylen
RA PACVD	Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapor Deposition, radio frekvenční plazmatem podpořená chemická depozice z plynné fáze
PI	propidium jodid
PVA	polyvinylalkohol
PEG-b	polyetylenglykol s navázaným biotinem
RIPA	lyzační pufr (NaCl, Tris, SDS, Triton X-100, deoxycholát sodný)
ROS	z angl. reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, kultivační médium
RT	z angl. room temperature, pokojová teplota
SD	směrodatná odchylka
sccm	z angl. standard cubic centimeters per minute, kubických centimetrů za minutu
Sox10	z angl. transcription factor SRY-related HMG-box 10, transkripční faktor SOX3
TPA	z angl. 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate, forbol 12-myristát 13-acetát
TRP	z angl. tyrosinase related protein, tyrozináze podobný protein
TNF	z angl. tumour necrosis factor, faktor nekrotizující nádory
UCEEB	Univerzitní centrum energeticky efektivních budov
UV	ultrafialové záření
XB2	myší linie keratinocytů
XPS	z angl. X-ray photoelektron spectroscopy, rentgenová fotoelektronová spektroskopie

1 Úvod

Vitiligo je onemocnění způsobující ztrátu, či snížení funkce melanocytů v kůži a ve vlasech, což vede k tvorbě světlých skvrn. Ačkoli je s prevalencí 2% nejčastějším depigmentační onemocněním na světě, jeho příčina zatím není zcela objasněna. Projevy snižují obranu organismu proti UV záření, zatěžují pacienty na úrovni psychické, sociální a celkově snižují kvalitu jejich života.

Velký zájem o nalezení účinné léčby vitiliga dokazuje i více než 60 klinických studií na toto téma publikovaných v posledních 45 letech (Eleftheriadou et al. 2011). Současná léčba se zaměřuje především na zastavení progresu onemocnění a repigmentaci zasažených míst. Dosažené výsledky však nejsou stoprocentní a u řady pacientů bývají jen dočasného charakteru. Jednou z metod léčby vitiliga je i transplantace autologní suspenze buněk bohaté na melanocyty.

V kombinaci s metodami tkáňového inženýrství je snaha zefektivnit tuto formu chirurgické terapie a to navržením biokompatibilního buněčného nosiče pro kultivaci a transplantaci melanocytů a také keratinocytů. Tento přístup by umožnil minimalizovat odběr dárcovské tkáně pro vytvoření transplantátu a pokrytí větší plochy lézí.

Jedním z materiálů tkáňového inženýrství jsou polymerní nanovlákná vyrobená metodou elektrostatického zvlákňování (EZ). Ta svou morfologií a rozměry do 1 μm napodobují strukturu extracelulární matrix. Velkou výhodou nanovláken je možnost jejich funkcionalizace bioaktivními látkami (růstové faktory, antibiotika aj.), což lze využít například pro cílené doručování léčiv, zlepšení proliferace buněk, hojení a buněčné adheze. Výhody nanovláken je předurčují k tomu, aby byly použity v chirurgické terapii vitiliga.

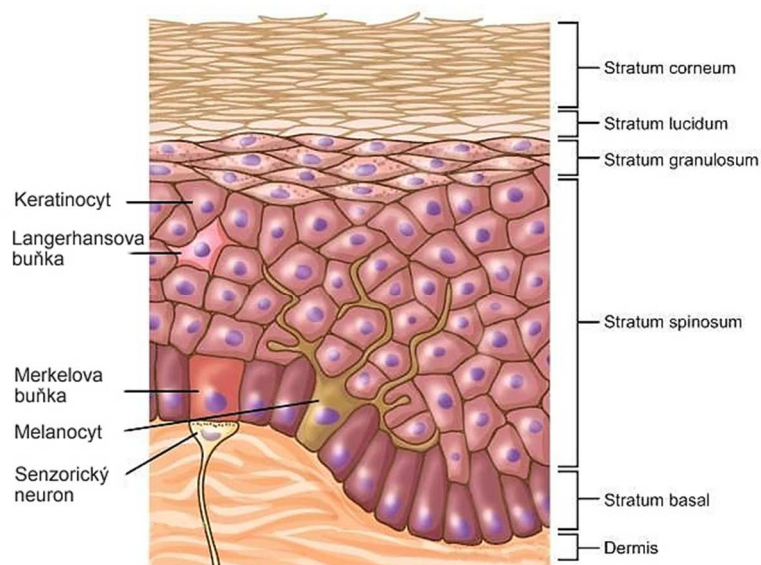
Cílem práce bylo vytvoření buněčného nosiče z nanovláken, který by byl vhodný pro kultivaci melanocytů a keratinocytů. Pro výrobu nanovláken jsme použili polyvinylalkohol (PVA), což je ve vodě rozpustný polymer, schválený pro biomedicínské aplikace. Jeho nevýhodou je však vysoká hydrofilnost, která snižuje ochotu buněk adherovat na materiály z něj vyrobené. Pro zlepšení povrchových vlastností PVA nanovláken byla použita modifikace studeným metanovým plazmatem.

2 Přehled literatury

2.1 Struktura a fyziologie kůže

Kůže tvoří přibližně 16% celkové hmotnosti člověka a její povrch představuje plochu až 2,5m². Kůže zabraňuje nadměrnému odparu vody, mechanickým poškozením organismu a také představuje bariéru pro cizorodé látky a patogeny. Jedná se o komplexní orgán, obsahující množství různých typů buněk, cévy, nervy, žlázy, tukovou tkáň, a proto plní v organismu celou řadu funkcí. Významnou částí se podílí na termoregulaci, metabolismu a vylučování látek. Plní funkci receptorového orgánu a v neposlední řadě je i místem tvorby vitamínu D3 a melaninu, který chrání buňky před škodlivým UV zářením, které způsobuje poškození DNA (Costin and Hearing 2007; Junqueira 1997; Picardo and Taïeb 2010).

Dělí se na tři základní vrstvy: epidermis, dermis a subcutis. Nejsvrchnější vrstva, epidermis, (Obr. č. 1), je tvořena z 95% keratinocyty, dále se v ní nacházejí melanocyty, Langerhansovy a Merkelovy buňky (Junqueira 1997).



Obrázek č. 1 : Schéma uspořádání epidermis, upraveno podle (URL1).

Keratinocyty tvoří rohovatějící vrstevnatý dlaždicový epitel. Proliferují z nejhlubší vrstvy epidermis zvané *stratum basale*, odkud migrují k povrchu, během této cesty diferencují, propojují se desmozomy, melanizují se, vytvářejí extracelulární matrix (keratin, lipidy) a jednotlivé podvrstvy epidermis. Konečným stádiem diferenciací jsou korneocyty, které se odlupují deskvamací a tvoří mnohavrstevné *stratum corneum* (Houben et al. 2007).

Na bazální lamině ve *stratum basale* (Obr. č. 1) a ve vlasových folikulech se nacházejí **melanocyty**, specializované dendritické buňky vzniklé delaminací buněk neurální lišty,

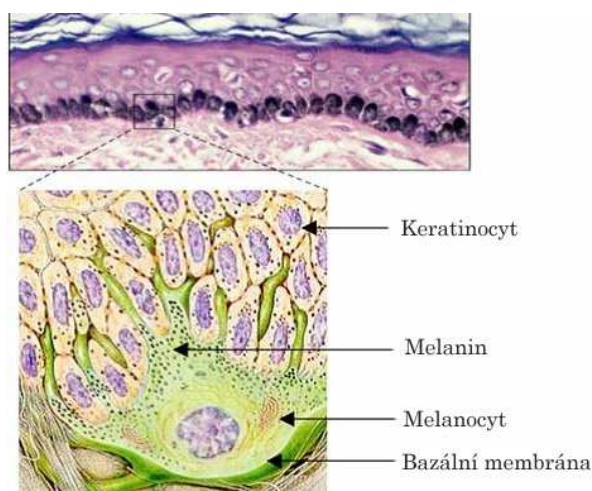
kteřé jsou zodpovědné za zbarvení kůže, vlasů a duhovky (Cichorek et al. 2013). Méně známý je jejich výskyt v řadě dalších částí těla: v uchu ve *stria vascularis*, dále v uveálním traktu vestibulárním regionu vnitřního ucha, ve sliznicích. V roce 2007 uveřejnil Goding článek zmiňující překvapivý výskyt melanocytů v srdci (Goding 2007) a o rok později Uyen našel tyto pigmentové buňky v mozku (Uyen et al. 2008).

2.1.1 Vývoj melanocyту

První nediferenciované prekursory melanocytů (melanogonie) se v lidské kůži objevují v osmém týdnu fetálního života (Jimbow et al. 1976). Pod vlivem sekretovaných faktorů (MITF, Pax3, Sox10 aj.) a regulace signálních drah proliferují, diferencují na melanoblasty, které migrují do cílových nik (Ernfors 2010; Mull et al. 2015). V epidermis pod vlivem transkripčních faktorů diferencují na dendritické melanocyty, produkující melanin. Ve vlasových folikulech melanoblasty tvoří rezervoár nepigmentovaných oválných kmenových buněk, schopných diferenciovat v melanocyty (Nishimura et al. 2005; Osawa et al. 2005).

2.1.2 Funkce a syntéza melaninu

Uvnitř epidermálních melanocytů se ve speciálních organelách, melanozomech, vytváří pigmentovaný biopolymer melanin. Ten je pomocí dendritických výběžků distribuován do okolních keratinocytů. Každý melanocyt je svými dendrity spojen s 30 až 40 okolními keratinocyty, toto buněčné seskupení tvoří takzvanou melaninovou jednotku (Obr. č. 2) (Jimbow et al. 1976). Buňky melaninové jednotky sekrecí faktorů a fyzickým kontaktem vzájemně regulují své funkce, metabolickou aktivitu, proliferaci a diferenciaci (Hirobe 2014).



Obrázek č. 2 : Epidermální melaninová jednotka – melanocyt ve stratum basale v kontaktu s okolními keratinocyty. Upraveno podle (Uyen et al. 2008).

Melanin je odvozený z aminokyseliny tyrosinu a v těle živých organismů se vyskytuje v několika formách. Nejčastější formou je hnědý až černý pigment eumelanin, což je heterogenní polymer složený z jednotek DHI (5,6-dihydroxyindol) a DHICA (5,6-dihydroxyindol-2-karboxylová kyselina) (Yamaguchi et al. 2010).

Jeho méně obvyklá žluto-červenohnědá forma se nazývá feomelanin. Ten má odlišnou chemickou strukturou, protože obsahuje benzothiazinové deriváty se sírou a je zodpovědný za zrzavé vlasy a pihy (Costin and Hearing 2007; Riesz 2007). V mozku v oblasti *substantia nigra* produkují dopaminergní neurony neuromelanin, jehož nedostatek je spojován s neurálními chorobami, například Parkinsonovou chorobou (Fedorow et al. 2005; Zhang et al. 2011).

2.1.3 Funkce v organismu

Melanin v epidermis chrání buňky před škodlivým působením UV záření o vlnové délce 280-320 nm, neboť ho dokáže absorbovat a přeměnit 99,9% záření na teplo (Meredith and Riesz 2004). Nedostatek melaninu v kůži (albinismus, světlý typ pleti, vitiligo aj.) vede k nedostatečné obraně těla proti škodlivým účinkům slunečního záření, což zvyšuje riziko vzniku karcinomů a melanomů (Junqueira 1997).

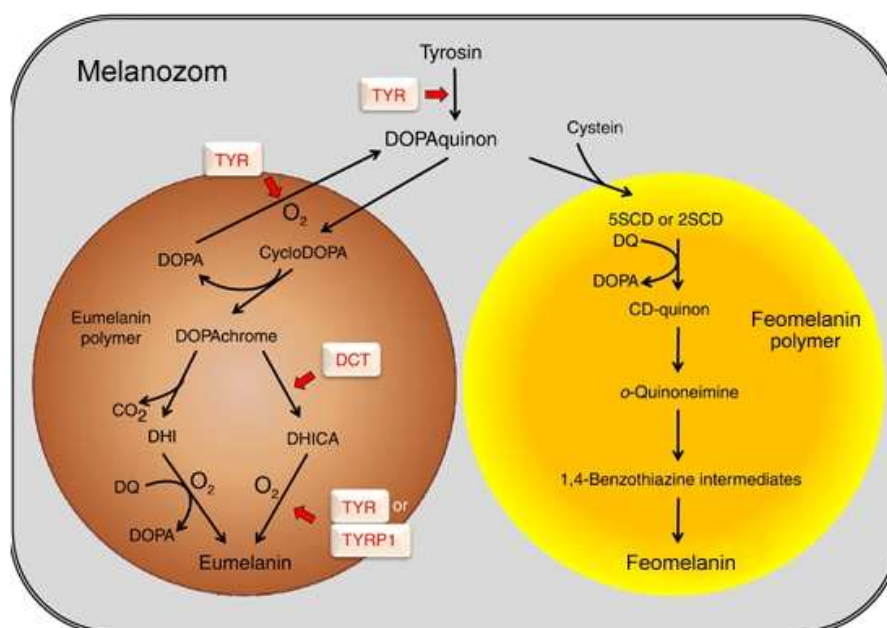
Fotoprotektivní charakter melaninu v epidermis je dán tím, že zde funguje jako pseudo-dismutáza. Spektrofotometrickou analýzou bylo zjištěno, že s klesající vlnovou délkou záření roste absorbance melaninu, která dosahuje svého maxima v okolí vlnové délky 335 nm (URL4; Riesz 2007). Tím v buňkách minimalizuje vznik a toxické působení reaktivních forem kyslíku (ROS), čímž chrání DNA, proteiny a membránové lipidy před poškozením (Costin and Hearing 2007).

Kromě fotoprotekce mají melaniny i detoxifikační funkci, neboť na sebe váží volné radikály (Potsch et al. 2002), ionty, přechodné kovy (Fedorow et al. 2005), ale i toxické a chemické látky (Costin and Hearing 2007).

2.1.4 Syntéza melaninu

Jak již bylo zmíněno v úvodu kapitoly, melanin je syntetizován v melanozomech, oválných, membránou obklopených organelách o velikosti 200x900 nm. Jsou podobné lysozomům a nacházejí se v cytoplazmě melanocytů. Obsahují proteiny tvořící scaffold pro uložení melaninu a enzymy regulující biosyntézu pigmentu. Pro buňky jsou důležité, protože je chrání před reaktivními prekursory melaninu (fenoly, chinony), které by mohly oxidovat lipidy plazmatické membrány (Uyen et al. 2008).

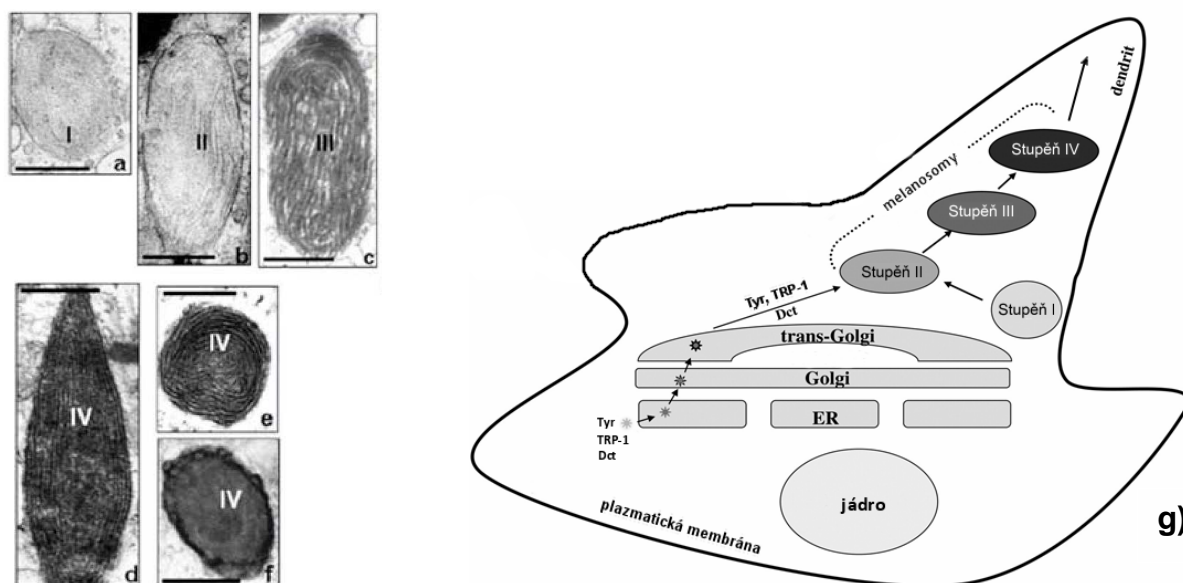
Pro syntézu melaninu a vznik zralého melanosomu vhodného k transportu do keratinocytů, je potřeba takéž správné pH, osmotický tlak a celá řada adaptérových proteinů (například AP1-4, kladrín, gp100, P-protein, Lamp-1, Silver) (Uyen et al. 2008).



Melanozomy zrají ve čtyřech stádiích, která mění svůj vzhled a lokalizaci v rámci melanocyty (Obr. č. 4). Postupně se nepigmentovaný váček bez TYR aktivity (Stupeň I) vyvíjí v melanozom s aktivní TYR a melaninem uloženým na proteinové matrix (Stupeň II). Váček migruje k periferii a plní se melaninem (Stupeň III). V posledním stádiu mění svůj vzhled až na plně melanizované zralé granulum, s nízkou TYR aktivitou (Stupeň IV) (Costin and Hearing 2007).

Melanozomy jsou enterográdním transportem za účasti buněčných motorů asociovanými s cytoskeletem dopraveny do dendritů. Odtud se dostávají do keratinocytů pravděpodobně fagocytózou s aktivní účastí melanocytů (Kasraee et al. 2011).

Ve vlasových folikulech se melanocyty nacházejí mezi dermální papilou a buňkami vlasového epitelu vlasu, do kterých předávají melanin obdobným způsobem, jako v epidermis, čímž ovlivňují barvu vlasu (Junqueira 1997).



Obrázek č. 4 : **a-f)** zrání melanosomů obsahujících eumelanin, snímky z elektronového mikroskopu, upraveno podle (Uyen et al. 2008). **g)** schéma syntézy, maturace a transportu melanosomů do dendritů v rámci melanocyty, se znázorněnými nejdůležitějšími enzymy, tyrosináza (Tyr), tyrosinase related protein 1 (TRP-1) a DOPAchrome tautomeráza (Dct). Upraveno podle (Costin and Hearing 2007).

Pigmentaci kůže je tedy ovlivněna komplexem procesů. V první řadě schopností diferenciace a migrace melanoblastů (melanocytárních prekursorů), dále distribucí a aktivitou melanocytů v epidermis, formou melaninových granul (barva, tvar, velikost), taktéž schopností melanocytů vytvářet dendrity a mírou účinnosti transportu melanosomů do keratinocytů v rámci melaninové jednotky. Zásadní je pak míra konstitutivní a stimulované exprese genů enzymů účastnících se biosyntézy melaninu. Klíčovým enzymem je TYR, která zahajuje celý proces syntézy a tím ovlivňuje rychlost a množství tvorby melaninu. Barva kůže také souvisí s rychlostí degradace melanosomů v keratinocytech a v melanocytech samotných (Jimbow et al. 1976).

2.1.5 Faktory ovlivňující tvorbu melaninu

Syntéza melaninu je ovlivněna jak endogenními, tak i exogenními vlivy. Parakrynně nebo autokrinně na melanocyty působí růstové faktory, endotelíny, cytokíny, mediátory

zánětu a jiné látky produkované okolními buňkami (zejména se jedná o keratinocyty a v menší míře fibroblasty).

Keratinocyty produkují faktory, kterými v rámci melaninové jednotky regulují kromě melanogeneze i proliferaci, diferenciaci, či dendritizaci melanocytů. Jedná se například o sekretované faktory α -MSH, ACTH, bFGF, NGF, endotelíny, GM-CSF, LIF, HGF (Costin and Hearing 2007). Taktéž bylo zjištěno, že absence kontaktu melanocytů s keratinocyty vede ke snížené tvorbě eumelaninu a intenzivnější syntéze feomelaninu (Shin et al. 2012). Samotný buněčný kontakt keratinocytů s melanocyty je nezbytný pro správnou distribuci melaninu v epidermis.

Významným vnějším faktorem je UV záření. Dělí se na UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) a UVC (200-280 nm) záření. První dva typy jsou absorbovány kůží a mají vliv na aktivitu melanocytů a tvorbu melaninu v epidermis. Nadměrné vystavení UVB způsobuje spálení pokožky a má karcinogenní efekt, stejně jako UVA, které sekundárně způsobuje zlomy v DNA působením ROS (Costin and Hearing 2007).

Překvapivé byly výsledky *in vitro* studie, která ukázala, že podobný účinek, jako UV záření má na melanocyty působení tepla. V rámci studie se po teplotním šoku zvýšila aktivita melanocytů a bylo docíleno vyšší míry dendritizace těchto buněk (Nakazawa et al. 1998).

2.2 Vitiligo

Je depigmentační onemocnění, které se projevuje snížením funkce až úplnou ztrátou melanocytů v epidermis, ve vlasech a výjimečně i ve sliznicích. U pacientů s vitiligem jsou proto charakteristické depigmentované léze v podobě světlých skvrn na různých částech těla (Obr. č. 5). Nejčastěji se vyskytuje ve tváři, v oblasti třísel a anogenitální krajině, dále na končetinách především v místech zvýšeného tlaku a tření. Celosvětová prevalence se pohybuje v rozmezí 0,5-2% v závislosti na lokalitě (Krueger and Schallreuter 2012). Což z něj dělá nejčastější depigmentační onemocnění na světě (Ezzedine et al. 2015).

Projevy tohoto onemocnění mají značný vliv na kvalitu života pacientů, o čemž pojednává řada studií zvažující vliv jak z hlediska psychologického tak i sociálního (Costin and Hearing 2007; Ongena et al. 2006). V místech léze ztrácí kůže přirozenou ochranu proti škodlivému UV záření a je náchylnější ke spálení. Taktéž se jedná se o výrazný kosmetický defekt, který je v některých kulturách považován za posedlost démonů, známky

sexuálního onemocnění, lepry aj. což narušuje sebevnímání jedince a jeho sociální kontakty (Alikhan et al. 2011).



Obrázek č. 5 : Vitiligo u mladého chlapce tmavé pleti, upraveno podle (URL2).

Podle míry postižení a podoby lézí se vitiligo dělí na segmentované, nesegmentované a neklasifikované vitiligo (Ezzedine et al. 2012b).

Segmentované vitiligo se vyskytuje méně, je diagnostikováno při jednostranné distribuci světlých segmentovaných skvrn, které jsou stabilní. Klasifikuje se na uni-, bi-, pluri-segmentové. Obvyklejší je **nesegmentované vitiligo**, které se vyznačuje symetrickými a bilaterálními bílými skvrnami s progresivním charakterem šíření. Klinicky se dále dělí a popisuje jako generalizované, akrofaciální, slizniční, smíšené či univerzální typ. Jednotlivé subtypy v sebe mohou přecházet díky progresivnímu charakteru onemocnění. Mezi vzácné formy vitiliga patří poměrně nedávno zavedené pojmy vitiligo minor, které se vyskytuje u lidí tmavé pleti a folikulární vitiligo, manifestující se ztrátou melanocytů ve folikulech (Ezzedine et al. 2012a). Vitiligo se může projevit v jakémkoli věku, u dětí i dospělých, ale nejčastěji se rozvine u mladých osob ve věku 10 až 30 let. Výsledky studií ukázaly, že existuje korelace mezi stářím dětí a zvyšováním prevalence vitiliga u dětí (Al-Refu 2012).

Malé izolované léze, které se po 1-2 letech sledování nevyvíjejí do segmentovaného, ani do nesegmentovaného vitiliga jsou označovány za neklasifikované vitiligo (Ezzedine et al. 2015).

2.2.1 Patofyziologie vitiliga

Vitiligo je považováno za multifaktoriální polygenně podmíněné onemocnění s komplexní etiopatogenezí, které předpokládá genetickou predispozici a vnitřní či vnější stresor (Yaghoobi et al. 2011). Konkrétní příčina vzniku doposud není zcela objasněna. Díky

tomu existuje několik teorií vzniku onemocnění, z nichž nejvíce diskutovanými jsou teorie autoimunitní, cytotoxická, neurohumorální a jejich kombinace.

K **autoimunitní teorii** se přiklání velká část odborníků, neboť pacienti spolu s vitiligem často trpí další autoimunitní chorobou (např. hyperthyreoidismem, revmatoidní artritidou, Addisonovou chorobou, lupénkou, diabetem melitem 1. typu, aj.) (Liu et al. 2005). Tato teorie je dále podporována zvýšenými hodnotami protilátek namířených proti pigmentovaným buňkám v séru pacientů a výskytem většího množství CD8+ T lymfocytů v oblasti lézí (Kemp et al. 2007). V několika studiích byla teorie podložena zjištěním deregulace řady genů účastnících se imunitní odpovědi (Ezzedine et al. 2015). Genetická analýza pacientů s generalizovaným vitiligem například odhalila tyrozinázu jakožto nejčastější autoantigen (Rezaei et al. 2007).

Neurohumorální teorie předpokládá sekreci toxických látek periferními nervy, které způsobují destrukci melanocytů. Toto tvrzení dokládá zvýšený výskyt neurotransmiterů (neuropeptid Y, norepinefrin) v depigmentovaných lézích, které mohou působit cytotoxicky, nebo melanocyty poškozovat hypoxií, která je navozena vasokonstrikcí okolní tkáně. Neurohumorální teorie vzniku vitiliga je podložena také případy, u kterých výskyt vitiliga kopíruje hranici dermatomu (Alikhan et al. 2011).

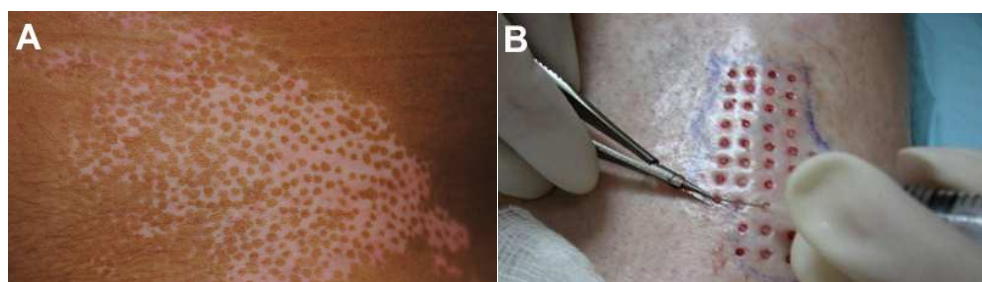
Kumulace toxických látek z metabolismu melanogeneze a environmentálních jedů (DOPA, dopachrom, fenoly, chinony aj.) má podle zastánců **cytotoxické teorie** jasný dopad na viabilitu melanocytů. ROS vznikající při metabolických dějích mohou poškodit melanocyty a spouštět zánětlivou kaskádu, vedoucí až k destrukci buněk a rozvoji vitiliga (Jimbow et al. 2001). Ve spojení s touto hypotézou proběhla *ex vivo* studie porovnávající melanocyty od pacientů s vitiligem a stejné buňky od zdravých osob. Při této kultivační studii vitiligo melanocyty vykazovaly větší míru oxidativního stresu a horší kultivovatelnost, než melanocyty od zdravých kontrol (Puri et al. 1987).

2.2.2 Současná léčba vitiliga

Přes velkou snahu objasnit příčiny vzniku vitiliga, je původ onemocnění stále nejasný a s tím jde ruku v ruce i neexistence efektivní léčby. U řady pacientů s mírnějšími projevy onemocnění je léčba relativně snadná. Pro dosažení repigmentace se nejprve volí konzervativní techniky v podobě podávání farmak a fotoléčby. U stabilních a refrakterních lézí konzervativní přístup nebývá účinný a proto se přistupuje k chirurgické léčbě ve formě autologních transplantátů kožních štěpů (Obr. č. 6B) nebo aplikaci suspenze melanocytů. Zvýšený zájem je i o genovou terapii vitiliga, ale ta je podmíněna detailní znalostí

patofyziologie a genetického pozadí tohoto onemocnění (Eleftheriadou et al. 2011). Naopak léčba transplantací kmenových buněk ve formě melanocytárních prekursorů z vlasových folikulů je intenzivně studována, neboť tyto buňky se zásadním způsobem podílejí na obnovení pigmentace u vitiligo pacientů (Lee and Fisher 2014).

Repigmentace lézí probíhá díky aktivaci rezervoáru melanocytárních prekursorů/kmenových buněk (folikulární repigmentace, Obr. č. 6A), stimulaci nepoškozených melanocytů v depigmentovaných lézích, nebo migraci zdravých melanocytů z okolní zdravé tkáně (Daniel and Wittal 2015; Falabella 2009). Velký potenciál v léčbě vitiliga je především aktivace kmenových buněk, které po stimulaci (UV, farmaka) vycestují k epidermis, kde dozrávají v melanocyty produkující melanin (Falabella 2009). Positivní z hlediska léčby vitiliga je, že residua těchto buněk byla prokázána ve vlasových folikulech i interfolikulárním prostoru v oblasti vitiligo lézí (Seleit et al. 2014).



Obrázek č. 6 : **A)** folikulární repigmentace po aplikaci konzervativní léčby, **B)** transplantace epidermálního štěpu (mini-grafting), upraveno podle (Daniel and Wittal 2015).

Všeobecně je odpověď na léčbu nejlepší v časném stádiu onemocnění, u mladých pacientů a u osob tmavé pleti. Z hlediska místa postižení se repigmentace nejlépe dosahuje na obličeji, trupu a krku. Naopak končetiny a sliznice bývají rezistentní, především při aplikaci konzervativní léčby (Felsten et al. 2011). Je to způsobeno i tím, že na těchto místech (dlaně, plosky, sliznice) nejsou vlasové folikuly, tudíž zde chybí rezervoár melanocytárních kmenových buněk (Falabella 2009).

Pomocí kosmetických přípravků a vyhýbání se opalování, je možné světlé skvrny kamuflovat či snížit jejich výraznost. Řešením pro rezistentní oblasti může být i mikrotetování, které je vhodné pro oblasti u kterých se repigmentace dosahuje velmi obtížně (rty, konečky prstů, bradavky, aj.) (Daniel and Wittal 2015). Tyto formy zakrývání neléčí příčinu vzniku vitiliga, nicméně pro značnou část pacientů je to možnost, jak minimalizovat nežádoucí vliv vitiliga na kvalitu jejich života (Holme et al. 2002).

Farmakologickou léčbu představuje aplikace kortikosteroidů, inhibitorů kalcineurinu a analogů vitamínu D3, které se preferenčně podávají lokálně. Účinek prvních dvou zmíněných skupin spočívá ve schopnosti modulovat imunitní odpověď, stimulovat nové osídlení melanocyty a produkci melaninu v oblasti lézí. Inhibitory kalcineurinu (tacrolim) jsou v porovnání s kortikosteroidy bez nežádoucích účinků, ale mají slabší výsledky. Analogy vitamínu D3 podporují melanogenezi a dozrávání melanocytů (Felsten et al. 2011).

Zvažuje se i terapie pomocí inhibitorů TNF- α , prozánětlivý cytokín spojovaný s autoimunitními onemocněními, který se ve zvýšeném množství vyskytuje u vitiliga v depigmentovaných oblastech a v jejich periférii. Předpokládá se, že blokování působení TNF- α zabrání destrukci melanocytů a podpoří se diferenciaci melanocytárních kmenových buněk (AlGhamdi et al. 2012). Nicméně je třeba objasnit vztah mezi vitiligem a TNF inhibitory, neboť řada studií naznačuje nebezpečí zhoršení a dokonce spuštění vitiliga spojené s jejich aplikací (Webb et al. 2015).

Opačným trendem je **depigmentace**, neboli zesvětlování kůže pomocí laseru (755 nm, 694 nm) (Rao and Fitzpatrick 2004), chemických látek (monobenzon methyl ester, 4-methoxyphenol aj.) a kryoterapie (Gupta et al. 2012). K tomuto zásahu se přistupuje, v případech kdy má pacient postižena viditelná místa (obličej, ruce), nebo pokud světlé skvrny tvoří více než 60 % těla (Daniel and Wittal 2015).

Již několik dekád se pro terapii vitiliga používá **fototerapie**, které se stále častěji kombinují s farmakologickou či chirurgickou léčbou, pro dosažení lepších výsledků repigmentace (Felsten et al. 2011). Fototerapeutické metody využívají vlivu UVA a UVB záření, které stimuluje migraci a proliferaci melanocytů, inhibuje autoimunitní pochody a vytváří vhodné prostředí pro repigmentaci. Mnoho studií ukázalo, že UVB záření je vhodnější pro terapii, protože vykazuje lepší výsledky a je méně škodlivé než UVA. Škodlivost terapie pomocí UVA spočívá v nutnosti současného podávání fotosensitivního psoralenu (PUVA terapie), nebo khelinu (KUVA), které jsou fototoxické a karcinogenní díky schopnosti vytvářet patologická propojení uvnitř DNA („cross-links“) (Carlie et al. 2003; Hofer et al. 2001).

Bezpečnější možností je aplikace NB-UVB (311-313 nm). Toto úzkopásmové záření stimuluje TYR v melanocytech a tím zvyšuje míru melanogeneze (Felsten et al. 2011). V poslední době se stále více používá monochromatický excimerový laser (308 nm). Ten umožňuje přesné cílení UVB terapie, bez zasažení okolní zdravé kůže s prokazatelně lepšími klinickými výsledky, oproti konvenční fototerapii (Al-Shobaili 2015; Park et al. 2012).

Značnou nevýhodou fototerapie je také nutnost pravidelné a opakované aplikace, přesnost v dávkách záření, relativně vysoké náklady na údržbu a provoz přístrojů. V současné době také probíhají studie zkoumající zda UVB terapie může zvýšit incidenci nádorového onemocnění kůže (Felsten et al. 2011).

Chirurgická terapie je možná transplantací autologního epidermálního štěpu, takzvané graftování, které je možné provádět ambulantně s lokální anestezií. Štěpy se nejčastěji získávají seříznutím subepidermální buly, která vzniká lokálním působením negativního tlaku (vakua) nebo laseru. Podle tloušťky a techniky získání epidermálního štěpu se rozlišují kožní štěpy v plné tloušťce („full thickness grafts“), štěpy epidermis s částí dermis („split thickness grafts“) a epidermální puchýře. Z porovnání více než šedesáti studií autologní transplantace se jakožto neúčinnější technika jeví použití štěpů z epidermálních puchýřů a štěpů, které obsahují i část dermis (Daniel and Wittal 2015; Njoo et al. 1998).

Při transplantaci epidermálního puchýře je pacientovi odebrán štěp normálně pigmentované kůže z vrchní části puchýře vytvořeného nejčastěji pomocí vakua. Štěp je následně aplikován na recipientní místo stejné velikosti zbavené epidermis (dermabrasí, vytvořením puchýře). Oproti jiným transplantacím technikám je zde nižší výskyt jizev, ale ne vždy je dosaženo repigmentace. Procedura je časově náročná a vyžaduje speciální vybavení pro tvorbu puchýřů (Njoo et al. 1998).

Technika nazývaná mini-grafting (punch grafting) spočívá v aplikaci malých (1-2 mm) biopsií zdravé kůže do depigmentovaných oblastí ošetřených dermabrasí (Obr. č. 6B). Metoda je ale časově náročná, s častým zjizvením a dlaždicovitým vzhledem v místě aplikace. V případě štěpů s částí dermis je mechanicky nebo chemicky provedena jemná dermabrasi na depigmentovaném místě, tím se odstraní vrchní epitel. Sem je posléze aplikován štěp normálně pigmentované kůže (Njoo et al. 1998).

Na chirurgickou formu léčby nejlépe odpovídají léze na končetinách (Felsten et al. 2011). Limitem chirurgické terapie je, že bez zjizvení či hyperpigmentace v místě odběru je možné pokrývat pouze malé depigmentované léze (Daniel and Wittal 2015; Njoo et al. 1998).

Druhým způsobem chirurgické léčby je přímá aplikace autologní buněčné suspenze bohaté na melanocyty (Gauthier and Benzekri 2012). Pro zvýšení počtu transplantovatelných buněk a pokrytí větší plochy lézí byly použity melanocyty kultivované *in vitro*. Kultivační proces je však limitován cenou, potřebným časem a odborným personálem (Hong et al. 2011a; 2011b).

Při autologní transplantaci se buněčná suspenze nanáší na deepitelizovaný povrch. Je možné transplantovat buď samotné melanocyty, nebo směs melanocytů a keratinocytů.

Eves et al. (2005) uvádí, že transplantáty s oběma typy výše zmíněných buněčných typů zrychlují hojení deepitelizované rány a tím minimalizují tvorbu jizev.

V pilotní studii použil Mulekar et al. (2008) nekultivované autologní buněčné suspenze pro léčbu vitiliga a zároveň prezentoval transplantační kit (ReCell, Avita Medicine Europe) s kterým dosáhl velmi dobrých výsledků s vyšší efektivitou repigmentace v porovnání s běžně používaným graftováním. Další srovnávací studie repigmentace vitiligo lézí po aplikaci suspenze melanocytů a keratinocytů na dermabrasí ošetřené léze se uskutečnila v Íránu. U poloviny pacientů bylo dosaženo 96-100% repigmentace po 4 měsících od aplikace (Toossi et al. 2011).

Výhodou metody je, že oproti kultivovaným suspenzím není třeba laboratorních pracovníků a vybavení, proces je rychlý a nebezpečí kontaminace, malignance a infekce buněk je minimální. Naopak nevýhodou metody je problém s udržením transplantovaných buněk v místě léze a jejich rovnoměrné rozmístění. Tkáňové inženýrství, jakožto rychle se rozvíjející obor, by mohl přinést řešení terapie vitiliga v podobě biokompatibilního buněčného nosiče („scaffoldu“) vhodného pro adhezi, kultivaci a následnou transplantaci epidermálních buněk, zejména melanocytů.

2.2.3 Buněčné nosiče v terapii vitiliga

V literatuře se v souvislosti s terapií vitiliga objevila řada přírodních i syntetických biomateriálů použitých pro kultivaci melanocytů, respektive epidermálních buněk. Příkladem je autologní transplantace melanocytů kultivovaných na amniotické membráně (získaná při císařském řezu z lidské placenty) s úspěšností repigmentace v 90-100% (Redondo et al. 2008; 2011). Klinická studie potvrdila že amniotická membrána je vhodným nosičem pro transplantace melanocytů a je efektivnější než aplikace samotné suspenze buněk při léčbě stabilního vitiliga (Gimenez-Azcarate et al. 2013). Andreassi et al.(1998) použil pro *in vitro* kultivaci melanocytů a keratinocytů nosič z kyseliny hyaluronové (HA), který následně transplantoval pacientům s vitiligem. Dalším příkladem použití přírodních polymerů je semipermeabilní membrána z chitosanu pro kultivaci lidských melanocytů, která byla úspěšně transplantována na zvířecí model (Xu et al. 2012). Výhodou je i skutečnost, že chitosan podporuje tvorbu melanocytových sféroidů (Lin et al. 2006).

Syntetické nosiče pro kultivaci melanocytů byly vyrobeny například z nylonu a chitosanu, polystyrenu (Lin et al 2005), polyetylen tereftalátu (Huang et al. 2013), polymléčné kyseliny (PLA) (Ghosh et al. 2012), dále z plasmou ošetřeného silikonu a PVC (Eves et al. 2008), nebo polystyrenu. Pro kultivaci keratinocytů a melanocytů posloužil i

kompozit alylamidu s akrylovou kyselinou (Eves et al. 2005) nebo plazmaticky polymerizovaný alylamin s 1,7 oktadienem (Beck et al. 2003).

2.3 Nanovláknna v tkáňovém inženýrství

Tkáňové inženýrství je obor, který kombinuje principy přírodních věd a inženýrství. Základní myšlenkou je urychlení regenerace nebo náhrada poškozené tkáně pomocí buněčných nosičů vyrobených ze syntetických nebo přírodních materiálů (Langer and Vacanti 1993; Rim et al. 2013). Uměle vytvořené nosiče mají primárně poskytnout buňkám mechanickou oporu a zároveň podporovat jejich adhezi, diferenciaci a proliferaci v místě aplikace. Dále mohou sloužit jako nositelé bioaktivních látek a signálních molekul, které po uvolnění urychlují regenerační procesy.

Při navrhování buněčného nosiče je nutné nejprve vybrat vhodný materiál pro jeho výrobu. Ten by měl být biokompatibilní, biodegradabilní a mechanicky odolný. Na navržených nanovláknenných nosičích se nejprve testuje adheze, viabilita, proliferace, případně diferenciaci buněk *in vitro*, což je podmínkou před použitím v preklinických a klinických testech *in vivo*.

Jedním z mnoha typů biomateriálů jsou polymerní **nanovláknna** vyrobená metodou elektrostatického zvlákňování (podrobně popsáno viz níže). Svými malými rozměry a pórovitou strukturou připomínají ECM, zároveň jsou dostatečně mechanicky odolné, čímž vytvářejí vhodné prostředí pro kultivaci buněk a aplikaci jakožto buněčných transplantátů. Jemná struktura nanovláken poskytuje velký specifický povrch, který je přístupný pro adhezi buněk i navázání faktorů ovlivňujících například růst a výživu buněk. Výhodou nanovláken je možnost řízení řady jejich vlastností přímo při jejich výrobě (porozita, průměr vláken, orientace). Další výhodou je možnost určení vlastností (funkcionalizace) nanovláken uzavřením bioaktivních látek dovnitř vláken (koaxiálním zvlákňováním, zvlákněním směsi polymeru a bioaktivní látky (Buzgo et al. 2013; Mickova et al. 2012), či navázáním molekul na jejich povrch (růstové faktory, proteiny, aj. (Buzgo et al. 2015). Kryogenním mletím se z nanovláknenných materiálů dají připravit injikovatelné nano- a mikročástice, které nabízejí další možnosti využití nanovláken v biomedicině (Knotek et al. 2012). Nosiče na bázi nanovláken tak mohou být vyrobeny „na míru“ určitému buněčnému typu a tkáni, kam budou následně aplikovány.

V dermatologii mohou být nanovláknna využita zejména pro hojení nebo jako kryty ran a (Choi et al. 2008; Powell et al. 2008), pro kultivaci keratinocytů a fibroblastů (Boese et al.

2007; Kang et al. 2010), nebo jako efektivní systém doručování antibiotik a jiných léčiv přímo do rány (Goonoo et al. 2014). Kromě zmíněného použití v tkáňovém inženýrství a doručování léčiv nacházejí nanovlákná své uplatnění v medicíně také jako ochranné a filtrační textilie (Liang et al. 2007; Lu and Ding 2008), nebo jako součásti náhrad orgánů (Kim et al. 2008; [URL3](#)).

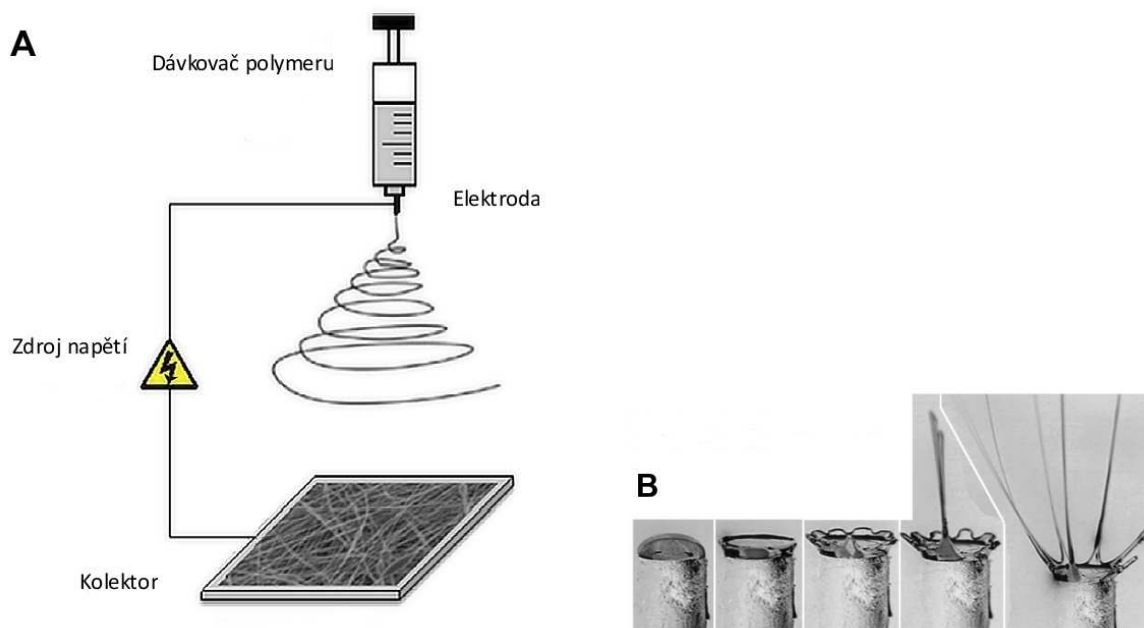
2.4 Elektrostatické zvlákňování

Základy elektrostatického zvlákňování (EZ) byly položeny již v 19. století (Rayleigh 1882). Dalšího rozvoje se tato metoda dočkala o dekády později s hlubším pochopením jejich principů a o jejím komerčním využití se začalo uvažovat až po roce 1990 (Vasita and Katti 2006). Během několika desetiletí tak byla vyvinuta a patentována řada přístupů umožňujících elektrostaticky zvláknit nejrůznější syntetické i přírodní polymery a taktéž jejich směsi (Agarwal et al. 2008). Laboratoře po celém světě testovali potenciál nanovláknenných nosičů vyrobených EZ například pro rekonstrukci kostní tkáně, tvorbu umělé cévy a neurální tkáně, léčbu ran a cílené doručování léčiv (Rim et al. 2013).

EZ umožňuje vyrobit vlákna o průměru v řádu desítek nm až několika μm (Agarwal et al. 2008). Metoda je poměrně nenáročná, velmi efektivní s vysokou výtěžností. Změnou parametrů přímo během výroby lze řídit vlastnosti vláken např. porozitu, průměr a tím jejich degradabilitu (Vasita and Katti 2006). Výhodná je i možnost vytvářet orientované vrstvy nanovláken díky speciálním kolektorům. Stacionární kolektory vytváří náhodně orientovaná vlákna, zatímco rotující kolektor navinuje vlákna jako nit na špulku a ty jsou orientována jedním směrem (Vyslouzilova et al. 2010). Významnou inovací metody bylo zavedení systému pro koaxiální zvlákňování, které umožňuje vyrobit nanovlákná s rozdílným materiálem na povrchu a uvnitř vlákna, využitelná pro cílené doručování léčiv (Sun et al. 2003).

Principem metody je působení vysokého napětí na roztok polymeru. Síly vznikající při tomto procesu vytahují vlákna z polymerního roztoku a ta jsou následně sbírána na kolektor v podobě nanovláknenných vrstev. Metoda nemá specifické požadavky, a proto ji lze provádět za pokojové teploty a při atmosférickém tlaku. Základní soustavu pro EZ tvoří zvlákňovací elektroda, zdroj napětí, roztok polymeru, který je do soustavy kontinuálně vytlačován pumpou a kolektor na kterém jsou vlákna sbírána (Obr. č. 7A). Různé podoby vláken lze docílit změnou výrobních parametrů, jakými jsou: přiváděné napětí do soustavy,

vzdálenosti zvlákňovací elektrody od kolektoru, vlhkosti a teploty v aparatuře, rychlosti toku či koncentrace polymerního roztoku atd. (Goh et al. 2013; Puppi et al. 2014).



Obrázek č. 7 : **A)** schematické znázornění soustavy pro elektrostatické zvlákňování, upraveno podle (Braghirolli et al. 2014). **B)** detail tvorby trysek při hladinovém elektrostatickém zvlákňování z tyčové elektrody (Lukas et al. 2009).

Elektroda je připojena na zdroj vysokého napětí a tvoří obvykle plusový pól soustavy, zatímco kolektor má záporný náboj, nebo je uzemněn. Roztok polymeru je vytlačen na hrdlo elektrody, kde na něj působí elektrické pole. Když dojde k vyrovnání povrchového napětí roztoku a elektrostatických sil na okraji kapaliny, utvoří se Taylorovy kužely (Taylor 1969). Ve chvíli, kdy převáží elektrostatické síly, vznikají na povrchu kapaliny trysky (Obr. č.7B), které jsou vytahovány ke kolektoru. Čím jsou trysky dále od zvlákňovací elektrody, tím jsou nestabilnější a podléhají ohybu, díky čemu se délka jejich letu ke kolektoru prodlužuje. Cestou se z roztoku polymeru odpařuje rozpouštědlo, vlákna se ztenčují, nakonec dopadají na kolektor, kde jsou sbírána (Goh et al. 2013; Lukas et al. 2008).

2.4.1 Polymery pro zvlákňování

Podle cílového použití vláken se pro elektrostaticky zvlákněné buněčné nosiče používají přírodní či syntetické polymery. Pro kombinaci pozitiv, které obě skupiny nabízejí, se používají jejich směsi, které kombinují výhodné vlastnosti přírodních a syntetických polymerů v jednom materiálu (Mohamed and Xing 2012; Rim, Shin and Shin 2013).

Přírodní polymery se vyskytují v živých organismech, proto jsou přirozeně biokompatibilní a biodegradabilní. Funkční skupiny, které poskytuje jejich povrch, jsou pro buňky „známé“ a ochotně na nich adherují a prolifерují. Přírodní polymery nejsou toxické ani

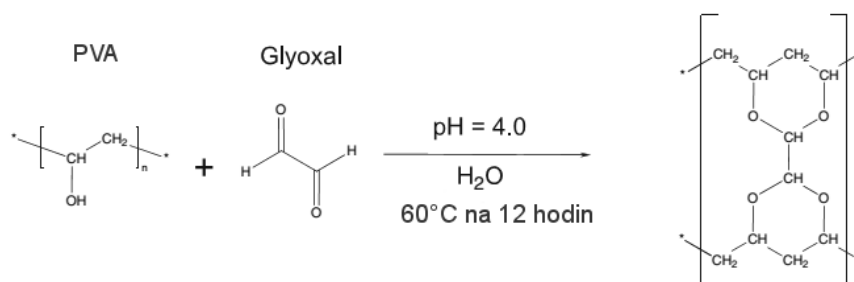
nezvyšují zánětlivou odpověď organismu (Mohamed and Xing 2012). Nicméně velkou nevýhodou pro aplikace ať už celulózy, fibronektinu, kolagenu či jiných přírodních polymerů v biomedicině, je rozdílnost původu těchto polymerů a z toho vyplývající nemožnost standardizace složení a jejich vlastností při *in vitro* kulturách.

Na rozdíl od přírodních polymerů, mají **syntetické polymery** definované složení, snáze se charakterizují, mají lepší mechanické vlastnosti, nižší rizika spojená s kontaminací a odlišností zdrojů surovin pro výrobu (Mohamed and Xing 2012). Elektrostaticky zvlákněna byla řada syntetických polymerů. Příkladem jsou vlákna vyrobená z biomedicínských PLA, polyglykolová kyselina (PGA), polykaprolakton (PCL), polyuretan a jejich kopolymerů (PLCL, PLGA, aj) (Sill and von Recum 2008).

Stále větší pozornost v oblasti biomateriálů je nyní věnována PVA. Tento ve vodě rozpustný polymer již byl schválen pro klinické použití (FDA, Conformité Européenne) (Ino et al. 2013). PVA lze elektrostaticky zvláknit, je biokompatibilní, nekarcinogenní a neimunogenní. Zajímavý je i z hlediska mechanických vlastností, přirozené přilnavosti k tkáním, inertnosti v tělních tekutinách a biodegradability (Alves et al. 2011; Chaouat et al. 2008; Jiang et al. 2010). Proto mu bude věnována následující kapitola.

2.4.2 Polyvinylalkohol (PVA)

PVA polymer se vyznačuje množstvím postranních hydroxylových skupin, které zapříčiňují jeho vysokou hydrofilitu a rozpustnost ve vodě. Díky tomu není nutné používat organická rozpouštědla a navíc je možné postranní skupiny chemicky modifikovat (Obr. č. 8) (Ding et al. 2011; Lin et al. 2012). Aby byla polymerní struktura i ve vodném prostředí stabilní, přidávají se do polymerního roztoku takzvaná síťovadla, která fungují jako spojky propojující jednotlivé řetězce polymeru. Příklad síťovací reakce zjednodušeně popisuje obrázek č. 8. Síťovací činidla jsou například dialdehydy glyoxal, či glutaraldehyd, které reagují s hydroxylovými skupinami PVA za vzniku acetátových vazeb (Zhang et al. 2010).



Obrázek č. 8 : Schéma síťování PVA pomocí glyoxalu a vysoké teploty, upraveno podle (Zhang et al. 2010).

Z hlediska používání má PVA poměrně dlouhou historii, neboť již od třicátých let byl používán v kosmetice, farmaceutickém, potravinářském a textilním průmyslu i v medicíně (Nair et al. 1998).

PVA má velkou schopnost vázat vodu, což se využívá v přípravě **PVA hydrogelů**, které mají budoucnost v oblasti bio-nanomedicíny (Alves et al. 2011). Z hlediska mechanických vlastností a elasticity mají potenciál v oftalmologii pro výrobu kontaktních čoček (Hyon et al. 1994), při rekonstrukci cév (Chaouat et al. 2008), chrupavek (Bodugoz-Senturk et al. 2009; Kobayashi et al. 2005), pro tvorbu měkkých tkání a náhradní kůže (Jiang et al. 2015).

Terapeutický potenciál v léčbě chronických i akutních ran PVA hydrogelů s tetrahydroxyboratem zmiňuje Rigon. Vyzdvihuje přirozenou přilnavost k tkáním, nízkou toxicitu a možnost řízeného uvolňování bioaktivních látek a léčiv z PVA hydrogelů přímo v místě aplikace (Rigon et al. 2015). Využití PVA v systémech doručování bioaktivních látek se zabývali dřívější studie, které prokázaly zachování aktivity enzymů po jejich uzavření do PVA nanovláken (Moreno et al. 2011; Shoba et al. 2014).

V posledních letech se jako systém pro léčbu ran a doručování léčiv testují také hydrogely ze směsi PVA s dalšími polymery např. chitosanem (Zhang et al. 2015), HA (Fahmy et al. 2015), alginátem a sukcinátem. Do hydrogelů jsou inkorporovány zejména antibiotika (Kamoun et al. 2015) a látky zlepšující hojení rány (Jaiswal et al. 2013).

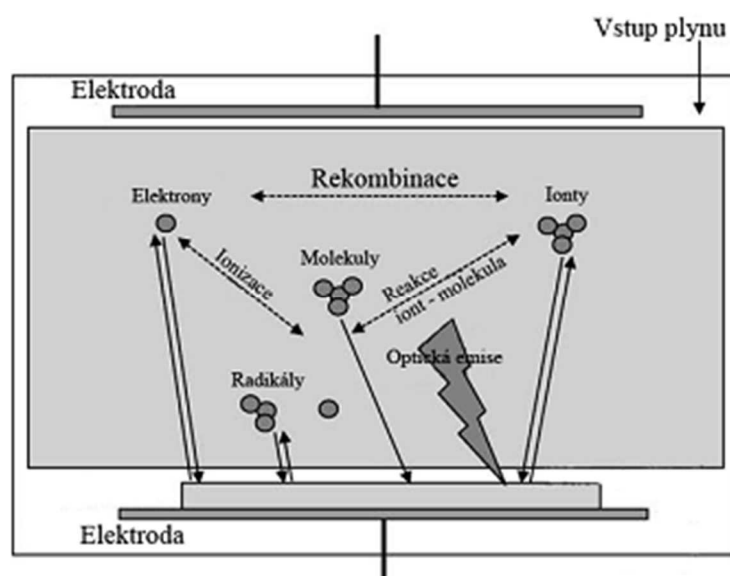
Matrice z PVA by mohly sloužit ke kultivaci kožních buněk, které jak se ukázalo velmi dobře adherují na hydrofilní materiály s nano a mikrostrukturami (Ranella et al. 2010). Měřením vlastností a mechanické odolnosti PVA vláken vyrobených EZ bylo zjištěno, že jsou dostatečně elastická a vhodná pro kožní aplikace a hojení ran (Jankovic et al. 2013).

Nevýhodou PVA nanovláken je jejich příliš vysoká hydrofilita, která způsobuje jejich nestabilitu ve vodném prostředí a snižuje ochotu buněk na ně adherovat. (Paradossi et al. 2003). Tuto vlastnost lze ovlivnit povrchovou úpravou. Například Buzgo et al. (2015) chemickou modifikací povrchu PVA nanovláken PEG-biotinovým linkerem (PEG-b) umožnil regulaci rozpadu PVA nanovláken ve vodě. Kovalentně vázaný biotin také testoval na vazbu k avidin-konjugovaným ligandům specifických primárních protilátek. PVA-PEG-b nanovláčka s navázaným anti-transferinem byla testována na schopnost vázat transferin. Dále byla PVA-PEG-b nanovláčka s navázaným anti-CD29 testována na schopnost vázat $\beta 1$ integrín a mesenchymální kmenové buňky. Výsledky prokázali, že protilátka ulehčila navázání $\beta 1$ integrínu k povrchu buněk a zároveň podpořila jejich adhezi k povrchu nanovláken (Buzgo et al. 2015).

Dalším možným řešením jak upravit povrch PVA nanovláken a zvýšit tak adhezivitu buněk k nim je modifikace nanovláken metanovým plazmatem.

2.5 Modifikace nanovláken plazmatem

Plazma je chemicky aktivní plyn, obsahuje velké množství reaktivních částic, které společně vytvářejí chemicky vysoce aktivní prostředí (Cheruthazhekatt et al. 2010). Uměle se vytváří v plazmatické komoře excitací molekul plynu do vysokoenergetických stavů (Obr. č. 9). Plazma proto obsahuje vysoce reaktivní částice – elektrony, ionty, radikály, fotony (UV) a neutrální částice (Raffaele-Addamo et al. 2006). Ty reagují s povrchem substrátu a mění tak jeho chemické složení. Kolizemi částic plazma ztrácí energii, z toho důvodu je nutné do systému neustále dodávat energii externím zdrojem. Ten bývá nejčastěji elektrický, dále chemický, termální či nukleární (Denes and Manolache 2004).



Obrázek č. 9 : Schéma dějů probíhajících při modifikaci povrchu v plazmatické komoře. Upraveno podle (Denes and Manolache 2004).

Přes vysoký obsah reaktivních molekul je celkový náboj plazmatu neutrální, neboť obsahuje stejné množství kladných i záporných iontů. Díky přítomnosti nosičů náboje, elektronů a iontů, je plazma elektricky vodivé prostředí (Tendero et al. 2006).

Jeho fyzikální a chemické vlastnosti jsou dány zařízením, které plazma generuje. Charakter plazmatu je proto ovlivněn tvarem vakuové komory a nastavením následujících parametrů: tlak plynu, průtok plynu do komory, výkon zdroje, respektive velikost a frekvence elektrické napětí přiváděného do prostoru komory (Strobel and Lyons 1994). Důležitou proměnnou při plazmatické úpravě je samozřejmě i čas a druh použitého plynu (Riccardi et

al. 2003). Pro biomateriály a medicínské využití se používají zejména tyto plyny: Ar, N₂, O₂, NH₃, CF₄, vzduch a jejich směsi (Siow et al. 2006).

Plazma se dělí na studené a horké podle zdroje a množství transferované energie, která vytvářejí samotnou plazmu. Horké má vysokou elektronovou hustotu, energii a teplotu částic. Ionizaci, excitaci a fragmentaci molekul způsobují jak elektrony, tak ionty. Elektron při srážce spotřebuje energii na vznik reaktivní částice a také na ohřev plynu. Horké plazma způsobuje rozpad organických molekul, a proto může být použito k modifikaci jen tepelně stabilních materiálů.

Studené plazma má nižší hustotu elektronů i celkovou energii, tudíž plyn v rektoru má nižší teplotu. Energie ze zdroje je předána elektronům, které se rychle pohybují, ohřívají a způsobují srážky, zatímco ionty a neutrální částice zůstávají téměř statické. Tím v plazmatu vznikají gradienty tlaku, teploty a hustoty částic. Výsledkem je reaktivní prostředí, jehož celková teplota se pohybuje okolo hodnot pokojové teploty. Proto se používá k modifikacím biologické tkáně a polymerních materiálů, neboť nedolávají vysokým teplotám (Heinlin et al. 2011; Tendero et al. 2006).

2.5.1 Využití plazmatu v biomedicíně

Plazmatická modifikace začíná být oblíbenou technikou v biomedicíně například pro ovlivnění biokompatibility a chemických vlastností biomateriálů (Wei et al. 2005). V řadě případů je vhodnější, než běžně používané chemické metody, jejichž nevýhodou je změna nasákavosti a častý obsah reziduálních rozpouštědel v ošetřeném substrátu. Povrchová úprava plazmatem zasahuje do materiálu jen do hloubky několika angströmů, díky tomu nenarušuje základní strukturu ani fyzikální vlastnosti ošetřeného materiálu. Celý proces je velmi komplexní a na výsledku se podílí řada parametrů, tudíž nelze odhadnout přesné množství a rozmístění deponovaných funkčních skupin a atomů. Postup se proto optimalizuje na jedno konkrétní zařízení, čímž se zajistí reprodukovatelnost (Chan et al. 1996).

Pomocí plazmatu lze pokrývat materiály polymerními filmy, leptat, rekombinovat molekuly za vzniku sloučenin a implantovat ionty kovů na různé povrchy (Cheruthazhekatt et al. 2010; Chu et al. 2002). Plazmatickou modifikací lze cíleně měnit tvrdost, nasákavost, inertnost daného materiálu v tělních tekutinách, nebo sterilizovat živé tkáně a teplotně citlivé materiály (Heinlin et al. 2011).

Sterilizace plazmatem spočívá v narušení membrán patogenů radikály obsaženými v plazmatu (Heinlin et al. 2011; Mozetic and Vratnica 2011). Studené plazma se používá

pro sterilizaci polymerních materiálů využívaných v biomedicině PE, PVC a PET apod.. Vedlejším efektem bylo však naleptání povrchu sterilizovaného materiálu a zvýšení jeho hydrofobnosti (Mrad et al. 2013). V porovnání s běžně používaným etylen oxidem pro sterilizaci teplotně citlivých materiálů, je plazma časově nenáročné a efektivnější. Výhodnější je i proto, že při nedostatečné ventilaci po sterilizaci etylen oxidem se mohou v materiálu vyskytnout karcinogenní rezidua (Lee et al. 2006).

Leptání plazmatem vytváří strukturovanější a drsnější materiál, neboť na něm vznikají nerovnosti způsobené vyražením atomů na jeho povrchu. Plazma se používá k leptání polymerních filmů, zvýšení adheze buněk a proteinů, ošetření buněk i přesné odstranění části tkáně bez zánětlivých reakcí. (Heinlin et al. 2011). Leptáním za specifických podmínek je možné dosáhnout nano- či mikro-vzorování daného povrchu (Delgado-Rivera et al. 2011; Kylian et al. 2013).

2.5.2 Nanovlákná funkcionalizovaná plazmatem

Buňky jsou velmi citlivé na vlastnosti svého okolí, včetně podkladu. Řada studií prokázala, že adherentní buňky často mění své chování podle topografie, fyzikálních vlastností a chemického složení materiálů, na kterých jsou kultivovány (Scharnagl et al. 2010). Proto je buněčná afinita důležitým faktorem při vývoji biodegradabilních buněčných nosičů pro tkáňové inženýrství. Ošetření plazmatem umožňuje zavedení funkčních skupin (Taraballi et al. 2013), nebo imobilizaci krátkých peptidů, či proteinů ECM (lamininu, kolagenu, fibronektinu aj) na povrch materiálu, což zvyšuje jeho biokompatibilitu a funkčnost při kultivaci buněk (Riccardo et al. 2008; Yoo et al. 2009).

Funkcionalizací povrchu plazmatem je možné měnit hydrofobitu/hydrofilitu (Kowalonek et al. 2010; Luna et al. 2011), nebo hrubost substrátu, což má pozitivní efekt na adhezi a proliferaci buněk (Cheruthazhekatt et al. 2010). Různé typy plynů byly testovány pro úpravu hydrofilicity/hydrofobity a tím i buněčné adheze na nosičích z nanovláken (Yoo et al. 2009). Příkladem je práce Jeong et al (2009), kteří ošetřili nosič připravený z hedvábí, CH₄ plazmatem po dobu 30-180 sekund, což vedlo ke snížení jeho hydrofilicity. Již při ošetření materiálu po dobu 30s se zvýšila jeho hydrofobita a došlo ke změně funkčních skupin na povrchu. Sledován byl vliv CH₄ a O₂ modifikace plazmatem na aktivitu lidských keratinocytů a fibroblastů. Naopak Perk et al (2007) využili pro zvýšení hydrofilicity PLA, PGA a PLGA O₂ plazmat, čímž zlepšili adhezi a viabilitu fibroblastů na těchto hydrofobních polymerech. Taktéž aplikace plazmatu ze směsi plynů CH₄/O₂ v různém poměru mělo za následek zvýšení hydrofilicity PP (Lopez et al. 2009; Tsai et al. 2011).

Další metodou funkcionalizace nanovláken je takzvaná plazmatická polymerace, tedy vkládání molekul na povrch materiálu. Používá se pro vytváření biokompatibilních polymerních filmů pro zlepšení vlastností biomateriálů, například pro krytí ran (Chen et al. 2012), nanosení antikoagulační vrstvy pro zvýšení biokompatibility tělních náhrad a implantátů, nebo pro řízené uvolňování léčiv (Cheruthazhekatt et al. 2010; Yasuda and Gazicki 1982).

Plazmaticky funkcionalizovaná nanovlákná mohou být i nástrojem buněčného sortování. Příkladem je využití PCL nanovláken v kombinaci s plazmatickou úpravou (CF_4) pro oddělení rakovinných buněk od zdravých fibroblastů a keratinocytů, na základě nižší adheze rakovinných buněk k materiálu (Blackstone et al. 2012).

Zájem o téma funkcionalizace nejen nanovláken různými druhy plazmatu dokládá i množství literatury zabývající se imobilizací bioaktivních látek, tvorbou funkčních skupin a funkcionalizací buněčných nosičů touto metodou. Diskutován je i vliv těchto modifikací na osídlení substrátu buňkami a jejich chování (Bacakova et al. 2011; Siow et al. 2006).

Tenké filmy uhlíku mohou v medicíně sloužit k funkcionalizaci biomateriálů k zlepšení jejich biokompatibility a také ke kontrole uvolňování bioaktivních látek z polymerů (Asakawa et al. 2011; Enomoto et al. 2010; Liu et al. 2014). Přestože depozice uhlíkových filmů na polymerní i jiné typy biomateriálů pomocí plazmatu je poměrně známou technikou, v oblasti povrchové úpravy nanovláken zatím nebyla v literatuře popsána. I tyto poznatky nás vedly k navržení modelu pro testování vlivu plazmatické modifikace studeným metanem, konkrétně metodou RF PACVD, na vlastnosti a biokompatibilitu PVA nanovláken.

3 Cíle práce

- 1) Připravit biokompatibilní buněčné nosiče na bázi PVA metodou elektrostatického zvlákňování z hladiny.
- 2) Modifikace povrchu nanovláken PVA studeným plazmatem (metodou RF PACVD) a stanovení fyzikálně-chemických vlastností modifikovaných PVA nosičů
- 3) Testovat vliv plazmatické modifikace na adhezi, viabilitu a proliferaci myší linie keratinocytů a melanocytů *in vitro*.

4 Metodika

4.1 Materiál a metody

Tabulka č. 1 : Seznam chemikálií použitých v rámci diplomové práce

Název	Katalogové číslo	Výrobce	Země
BCECF-AM	B8806	Sigma Aldrich	Německo
Chloroform	1024452500	Merck	Německo
DiOC6(3)	FP-46764A	Interchim	Francie
DMEM	D6429	Sigma Aldrich	Německo
Sodium deoxycholate	30970	Sigma Aldrich	Německo
EDTA	E5134	Sigma Aldrich	Německo
Etanol	70390-11000	Penta	ČR
FBS	SV30180.03	HyClone	USA
Formaldehyd	14150-11000	Penta	ČR
Glyoxal	128465	Sigma Aldrich	Německo
Hoechst 33342	128465	Sigma Aldrich	Německo
KCl	16210-31000	Penta	ČR
KH ₂ PO ₄	12300-31000	Penta	ČR
Kyselina fosforečná	100250	Merck	Německo
L-glutamin	59202C	Sigma Aldrich	Německo
Zeta Potential Transfer Standart	DTS1235	Malvern	Velká Británie
Melanin	M8631	Sigma Aldrich	Německo
Metanol	21210-11000	Penta	ČR
MTS CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	G3581	Promega	USA
Na ₂ HPO ₄	15130-31000	Penta	ČR
NaCl	16610-31000	Penta	ČR
NaOH	16610-31000	Penta	ČR
Penicilin/Streptomycin	15760 -31000	Penta	ČR
Phalloidin.rhodamin	R415	Invitrogen	USA
Propidium jodid	MW 40 000	Wako	Německo
PicoGreen Quant-iT™ dsDNA Assay Kit	81845	Sigma Aldrich	Německo
PVA 5-88	1413541000	Merck	Německo
PVA 40-88	1413531000	Merck	Německo
RPMI	NCHZ	Sloviol	Slovensko
SDS	R0883	Sigma Aldrich	Německo
TPA	Q33120	Invitrogen	USA

Tris	08139	Sigma Aldrich	Německo
Triton TM X-100	Sloviol	NCHZ	Slovensko
Trypsin-EDTA	L3771	Sigma Aldrich	Německo
Tween-20®	P2287	Sigma Aldrich	Německo

Tabulka č. 2 : Seznam přístrojů použitých v rámci diplomové práce

Přístroj	Výrobní název	Výrobce	Země
Analytické váhy	T5939	Kern	Německo
Centrifuga	NF800R	Nüve	Německo
CO ₂ inkubátor	MCO-17AI	Sanyo	Japonsko
Fluorescenční reader	Synergy HT	BioTek	USA
Konfokální mikroskop	LSM 5 DUO	Zeiss	Německo
Laminární box	MSC 12	Thermo Scientific	USA
Mini centrifuga	C1008-B	Benchmark	Německo
Přístroj na měření Zeta potenciálu povrchu	Zetasizer Nano ZS	Malvern	Velká Británie
Optický mikroskop	Olympus IX51	Olympus	Japonsko
Plazmatická komora		Prevac Sp.z.o.o	Polsko
Pokovovací zařízení	Q 150R ES	Quorum	Velká Británie
Přístroj na měření povrchové energie	See System	Advex instruments s.r.o.	ČR
Scepter cell counter	Scepter 2.0	Milipore	USA
Skenovací elektronový mikroskop	Vega3	Tescan	ČR
Spektrofotometr	Infinite® M200 PRO	Tecan	Švýcarsko
Sterilizátor	SteriVac	MAC	ČR
XPS analyzátor		Specs	Německo
Zvlákňovací přístroj	Nanospider TM	Elmarco	ČR

4.2 Buněčné kultivace na nosičích

V experimentech *in vitro* byly použity dvě myší imortalizované linie buněk - keratinocyty XB2 a melanocyty Melan-a, které byly zakoupeny z buněčné banky Wellcome Trust Functional Genomics Cell Bank, při nemocnici svatého Jiří v Londýně.

Melan-a – jedná se o buněčnou linii pigmentovaných melanocytů, získána z embryonálních epidermálních melanoblastů z kůže imbrední myší linie C57BL. Melan-a melanocyty vyžadují pro kultivaci TPA a nižší extracelulární pH, jedná se o diploidní,

netumorogenní buněčnou linie, vhodnou pro buněčné studie *in vitro* a *in vivo* (Bennett et al. 1987). TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetát) je tumorový promotor, bez jehož přítomnosti se buňky špatně dělí a mají dlaždicový tvar, na rozdíl od obvyklého hvězdčovitého. Intracelulární odpověď na přítomnost TPA v médiu je aktivace protein kinázy C, což vede k proliferaci melanocytů. TPA *in vitro* substituují mitogenní faktory, které jsou přítomny *in vivo* (Bennett et al. 1987).

Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích s plochou 75 cm² v inkubátorech s 10% CO₂ atmosférou, při 37°C a 80–90% relativní vlhkosti vzduchu. Bylo použito médium RPMI-1640 s 10 % fetálního bovinního séra (FBS), 1 % směsi antibiotik (10 000 IU/ml penicilinu, 10 000 µg/ml streptomycinu), 2 mM L-glutaminem a 200 nM TPA. Médium bylo měněno 2x týdně. Po dosažení 80-90% konfluence byly buňky omyty sterilním PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) a pasážovány pomocí roztoku trypsin/EDTA do nových kultivačních lahví v poměru 1:5 – 1:20 dle potřeby.

XB2 - je immortalizovaná linie myších keratinocytů (Rheinwald and Green 1975). Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích s plochou 75 cm² v inkubátorech s 10% CO₂, při 37°C a 80 - 90% relativní vlhkosti vzduchu. Bylo použito médium DMEM (Dulbecovo modifikované Eaglovo médium) s přidavkem 10 % FBS a 1 % směsi antibiotik (10 000 IU/ml penicilinu, 10 000 µl/ml streptomycinu). Médium bylo měněno 2x týdně. Po dosažení 80-90% konfluence byly buňky pasážovány do nových kultivačních lahví v poměru 1:5-1:10.

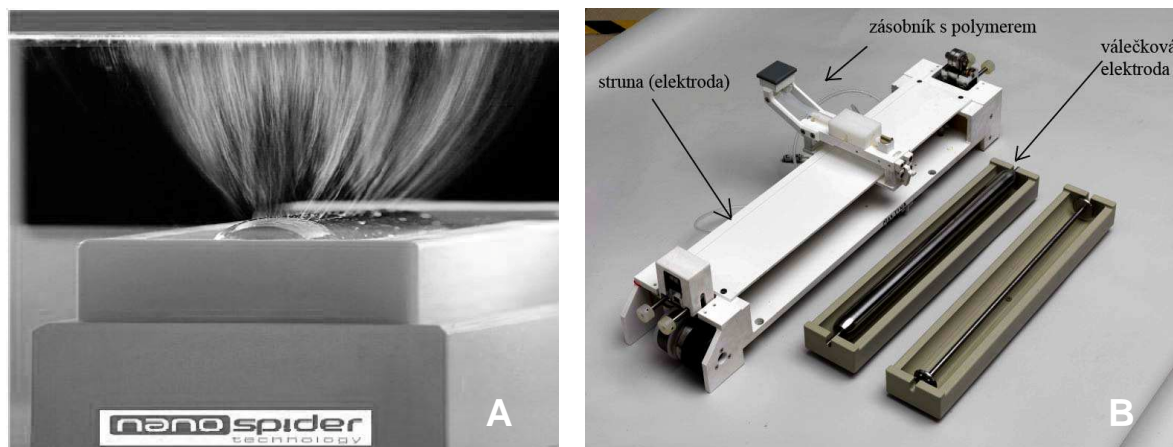
4.3 Elektrostatické zvlákňování

PVA 5-88, PVA 40-88, 40% glyoxal a 85% kyselina fosforečná. Všechny tyto chemikálie byly zakoupeny od firmy MERCK ve farmaceutické kvalitě.

Roztok polymeru pro zvlákňování byl připraven smícháním 5% (w/v) PVA 40-88, 5% (w/v) 5-88 PVA. PVA bylo rozpuštěno v destilované vodě na finální koncentraci 10% (w/v).

Před zvlákňováním bylo do rozpuštěného PVA přidáno 40,000 ppm glyoxalu (tzn. 4% hmotnosti čistého polymeru PVA), který slouží jako síťovací činidlo a 30,000 ppm kyseliny fosforečné, která katalyzuje síťovací reakce. Vzorky byly připraveny pomocí systému na zvlákňování z hladiny Nanospider™ (Obr. č. 10), vyvinuté na Technické univerzitě v Liberci. Zvlákňovací elektrodou byla struna, na kterou byl roztok polymeru soustavně nanášen pomocí pohyblivého zásobníku s průtokem 0.7. Napětí mezi elektrodou a kolektorem se pohybovalo v rozmezí 40–60 kV a vzdálenost elektrody od kolektoru byla 200 mm. Kolektor byl potažen speciální netkanou textilií *spunbond*, na kterou byla

vlákna zachytávána. Připravená vlákna PVA byla poté síťována v horkovzdušné troubě při teplotě 60°C, po dobu 48 hodin.



Obrázek č. 10 : **A)** systém Nanospider™ s probíhajícím zvlákněním z hladiny, upraveno podle (Jirsak and Petrik 2012). **B)** strunová elektroda systému Nanospider™ druhé generace, upraveno podle (Bezděková 2013).

4.4 Plazmatická modifikace

Nanovlákná byla modifikována, ve spolupráci s Katedrou materiálu na Technické Univerzitě v Liberci, v plazmatické komoře PREVAC založené na metodě RF PACVD (*Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapor Deposition*). Jedná se o variantu CVD podporovanou plazmatem doutnavého výboje, která k modifikaci materiálu využívá chemických reakcí vznikajících ve vysokofrekvenčním elektrickém poli, reagující látky jsou do vakuové komory dodávány ve formě plynů. Při procesu je možné nastavit kromě druhu přiváděného plynu i záporné napětí [V], průtok plynu [sccm], tlak vakua [Pa] a čas [min]. Zařízení se skládá z reaktoru ve tvaru válce, který funguje jako anoda a krytu s katodou, která je i plochou pro umístění vzorku. Rozměry plazmatické komory jsou: průměr – 345 mm, výška – 360 mm, průměr katody je 150 mm. Dolní elektroda je spojena přes regulační soustavu s generátorem elektrické energie vytvářející napětí o frekvenci 13,56 MHz s maximálním výkonem 1200 W. Řídicí a impedanční jednotka systému, umožňují přesné dodržování výše zmíněných parametrů v průběhu modifikace, což podstatně zlepšuje reprodukovatelnost celého procesu.

Plazmatická modifikace elektrostaticky zvlákněných a zasíťovaných PVA nanovláken byla provedena z obou stran kruhové výseče vzorků o průměru 12 cm. Okraje výsečí byly zatíženy nerezovými závažími, protože rozdílná výška vzorku by ovlivnila míru plazmatické úpravy. U všech vzorků bylo aplikováno konstantní záporné napětí 300 V na elektrodě a tlak vakua 30 Pa. Abychom docílili odlišných vlastností ošetřených PVA nanovláken, použili jsme

různé nastavení času působení aktivního plynu a průtoku plynu do komory (Tabulka č. 3). Plynem přiváděným do plazmatické komory byl metan.

Tabulka č. 3 : Parametry použité při plazmatické modifikaci nanovláken při konstantním záporném napětí 300 V a tlaku 30 Pa

Vzorek	Průtok plynu [sccm]	Čas [min]
PVA1	15	5
PVA2	10	5
PVA3	5	5
PVA4	15	2,5
PVA5	10	2,5
PVA6	5	2,5

4.5 Sterilizace nanovláken

Razidlem byla z připraveného materiálu vytlučena kolečka o průměru 6 mm, následně uzavřena do Petriho misek s proděravělým víčkem a sterilizována etylen oxidem při teplotě 37°C na oddělení centrální sterilizace Ústřední Vojenské nemocnice v Praze.

4.6 Analýza chemie povrchu a struktury nanovláken

4.6.1 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Vzorky sedmi skupin PVA nosičů byly přichyceny na podkladový terčik a následně pokoveny vrstvou zlata na přístroji Quorum Q150RS po dobu 120 s při proudu 20 mA. Pokovené vzorky byly pozorovány na skenovacím elektronovém mikroskopu Vega3 SBU od firmy Tescan při žhavicím napětí 15 kV při vysoké hladině vakua.

V programu ImageJ jsme na pořízených snímcích ze SEM měřili průměr vláken. Průměrná hodnota byla vypočítána z minimálně 100 měření jednotlivých vláken vždy z 2 snímků.

4.6.2 Rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS)

Jde o povrchově selektivní nedestruktivní metodu, která podává kvantitativní informace o složení a rozložení atomů na povrchu vzorku. Fotony emitované zařízením předávají energii atomům na povrchu vzorku v hloubce několika mikrometrů, následně jsou fotony z atomu uvolněny a jejich kinetická energie je detekována zařízením. Na základě

rozdílu počáteční energie fotonu a detekované kinetická energie emitovaných fotonů je vypočtena vazebné energie fotoelektronu v atomu (Kudrnová et al. 2009).

XPS měření byla provedena pomocí aparatury založené na komponentech firmy Specs. Použita byla Al anoda, která generuje rentgenové záření o energii 1486,6 eV. Emitované elektrony byly analyzovány pomocí hemisférického analyzátoru (Phoibos 100) v režimu FAT (*fixed analyzer transmission*). Přehledová spektra byla použita ke kvalitativní analýze, chemické složení vzorků a vzájemné prvkové vazby byly určeny ze spekter s vysokým rozlišením. K vyhodnocení byl použit program CasaXPS. Při měření nebyl použit monochromátor ani elektronové dělo pro kompenzaci nabíjení. Spektra byla kalibrována na vazebné energie 284.5 eV vazeb C-C/C-H. Měření proběhlo na spolupracujícím pracovišti, oddělení experimentální fyziky Univerzity J. E. Purkyně v Ústí nad Labem.

4.6.3 Smáčivost povrchu nanovláken (kontaktní úhel)

Důležitým parametrem materiálů pro buněčné kultivace je jejich smáčivost, kterou lze charakterizovat měřením kontaktního úhlu. Jedná se o úhel, který svírá tečna k povrchu kapky vedoucí z bodu, kde se kapka dotýká povrchu materiálu. V případě, že je hodnota kontaktního úhlu menší než 90°, lze takový povrch materiálu označit jako hydrofilní. V opačném případě, když je kontaktní úhel větší, než 90° jedná se o hydrofobní povrch.

Měření kontaktního úhlu bylo prováděno na přístroji See system (Advex-Instruments, s.r.o.). Přibližně 1 cm nad povrchem nanovláknenného vzorku byla aplikována 5 μ l kapka destilované vody. Současně byl fotografován pád a dopad kapky na povrch nanovláken při snímkové frekvenci 10 snímků za sekundu. Pro měření kontaktního úhlu byl následně vybrán snímek, který zachycuje okamžik usazení dopadnuvší kapky na povrch materiálu. Každý vzorek byl tímto postupem změřen desetkrát, výsledek je vyjádřen jako aritmetický průměr hodnot.

4.6.4 Měření zeta potenciálu povrchu (ζ)

Elektrostatický náboj blízko povrchu materiálu lze charakterizovat jako Zeta potenciál (ζ). Tato veličina popisuje míru interakce povrchu materiálu s nabitými částicemi roztoku. Povrch polymeru nese náboj, který na rozhraní mezi kapalinou-povrch způsobuje utváření elektrické dvojvrstvy. Při analýze se měří potenciál mezi hraniční nepohyblivou vrstvou kapaliny obklopující částici a vzdáleným objemem kapaliny.

Vzorky byly měřeny na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern). Manuálně byla v každém kroku posouvána hladina měření o 125 mikronů od povrchu vzorku. Následně byl

z hodnot 4 hladin měření (vzdáleností od povrchu vzorku) vynesel graf, určen Zeta potenciál (ζ). V každém hladině proběhlo automaticky 3x15 jednotlivých měření, program ZetaSizer automaticky do grafu vynesl odchylky jednotlivých měření a hladinu spolehlivosti měření (R^2). Analýza probíhala při RT, ve skleněné kyvetě Malvern ZEN 1020, s roztokem Zeta Potential Transfer Standart.

4.6.5 Absorpce proteinů (BSA) na nosiče

Jako reprezentativní protein byl vybrán BSA, globulární protein, který je často součástí médií pro kultivaci buněk. Taktéž se používá v biochemických modelech a jako referenční protein v řadě studií absorpce proteinů nejen na polymerní materiály (Buzgo et al. 2015; Kasalkova et al. 2014; Xu and Siedlecki 2007).

Ke vzorkům byla na 15 minut přidána dH₂O pro docílení jejich hydratace. Následně byly nosiče 60 minut inkubovány v RT s roztokem proteinu (100 ug/ml BSA v dH₂O). U roztoků získaných po absorpci BSA nosiči byla změřena fluorescence při vlnové délce 470/570 nm (excitace/emise) na přístroji Tescan. Jako referenční hodnota sloužil stejný postup na plastiku.

4.7 Buněčné kultivace na nosičích

Sterilní vzorky byly přeneseny do 96 jamkových kultivačních destiček. V jamkách bylo malé množství PBS (10-20 μ l) pro zvýšení přilnavost kolečka a usnadnění rozprostření nanovlákn na dně jamky. Buňky byly z kultivačních lahví pasážovány roztokem trypsin/EDTA, po oddělení od dna kultivační lahve byl trypsin blokován přidáním desetinásobku média s FBS. Buňky byly spočítány pomocí Bürkerovy komůrky, naředěny na požadovanou koncentraci a nasazeny do 96 jamkové destičky v malém objemu (20-30 μ l). Nechaly se na adherovat 2 hodiny v CO₂ inkubátoru. Poté jim bylo doplněno kultivační médium na finální objem 300 μ l. Každé 3-4 dny byla vyměňováno kultivační médium (150 μ l u XB2, 250 μ l u Melan-a) po celou dobu dvoutýdenního pokusu.

XB2 buňky byly nasazeny v počtu 4000 buněk na jamku (11765 buněk/cm²). Melan-a byly nasazeny v počtu 4400 buněk na jamku (38900 buněk/cm²). Pro barvení DiOC6(3)/PI na stanovení míry adheze buněk první den kultivace bylo nasazeno 8000 buněk/jamku (23530 cm²) jak Melan-a tak XB2.

4.7.1 Stanovení metabolické aktivity buněk (MTS)

Metabolická aktivita buněk byla stanovena pomocí MTS testu (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay MTS assay, Promega). V buňkách enzymy dýchacího řetězce metabolizují MTS na rozpustný formazan, jehož množství se následně stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 490 nm.

V dané experimentální dny (1., 3., 7., 10. a 14. den po nasazení) byly vzorky sterilně přeloženy do čisté 96 jamkové destičky, abychom vyloučili vliv buněk uchycených na stěnách a dně jamky. Ke každému vzorku bylo přidáno 120 μ l roztoku - obsahujícím 100 μ l standardního kultivačního média a 20 μ l MTS roztoku (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Celý postup byl prováděn za temna. Vzorky byly inkubovány s MTS roztokem 2 hodiny v inkubátoru při teplotě 37°C a 10% obsahu CO₂. Absorbance vzniklého formazanu byla měřena v nové destičce v objemu 100 μ l při vlnové délce 490 nm a 690 nm pro odečtení pozadí. Hodnoty absorbance vzorků byly vypočteny odečtením pozadí a odečtením hodnoty „blanku“, tzn. absorbance plného media s roztokem MTS bez buněk.

4.7.2 Kvantifikace DNA

Obsah DNA byl stanoven pomocí citlivé fluorescenční barvy PicoGreen (QuantiT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit, Invitrogen). Tato technika využívá mnohonásobného zesílení fluorescence barvy po vazbě na dsDNA, což umožňuje detekci i velmi malého množství dsDNA. PicoGreen se interkaluje do molekul dsDNA díky své struktuře, interakcí s malým žlábkem, elektrostatickým a Van der Waalsovým silám. Interakce s DNA stabilizuje molekuly barvy v excitovaném stavu a intenzita naměřené fluorescence je pak přímo úměrná množství dsDNA přítomné ve vzorku (Dragan et al. 2010).

Vzorky použité pro MTS test, byly přeneseny do 0,2 ml lyzačního pufru RIPA (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% deoxycholát sodný, 1% Triton X-100) a uchovány při -70°C. Pro uvolnění DNA ze vzorků byly ve třech cyklech rozmrazovány při pokojové teplotě, promíchány na vortexu a opětovně zmrazeny na -70°C. Mezi cykly byly vzorky promíchány na vortexu. Z každého vzorku bylo odebráno 10 μ l, doplněno 200 μ l pracovního roztoku PicoGreen. Vzorky byly nanášeny do černé 96 jamkové destičky (Corning 3603), aby bylo zabráněno prostupu fluorescence mezi sousedícími jamkami. Fluorescence jednotlivých vzorků byla měřena pomocí readeru Tecan při hodnotách excitace 485 nm, emise 523 nm. Pro sestavení kalibrační křivky byly v dubletech nanášeny standardy bakteriofága lambda

(součástí kitu, obsah DNA 0 – 10 ng/ μ l) a na základě kalibrační křivky byl vypočítán obsah DNA v jednotlivých vzorcích.

4.7.3 Obsah melaninu na nosičích

Celkový obsah melaninu na nosičích byl stanoven spektrofotometricky a to na vzorcích použitých pro kvantifikaci dsDNA a MTS test. Tyto vzorky byly přeloženy do nových mikrozkupek, ve kterých byl melanin z každého vzorku solubilizován inkubací se 150 μ l 1M NaOH, při 60°C po dobu 6 hodin. Pro lepší uvolnění melaninu z nosičů byly vzorky po inkubaci míchány na vortexu. Kalibrační křivka byla vytvořena naředěním syntetického melaninu (0-100 μ g/ml, Sigma Aldrich) v 1M NaOH. Poté byla změřena absorbance při 405 nm v objemu 100 μ l roztoku z každého vzorku na spektrofotometru Tecan.

4.8 Fluorescenční konfokální mikroskopie

4.8.1 Adheze buněk na nosiče

Snímky pro analýzu adheze buněk na nosiče byly pořízeny 1. den kultivace. Pro vizualizaci mitochondrií a vnitřních membrán byl použit DiOC6(3) (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide, Invitrogen) a PI pro obarvení buněčných jader.

Vzorky byly fixovány vymraženým metanolem (-20°C), dvakrát omyty PBS, inkubovány s DiOC6(3) v PBS (1 μ g/ml, 45 minut, ve tmě, při RT) a následně v roztoku PI v PBS (5 μ g/ml, 10 minut, RT, ve tmě). Vzorky byly mezi jednotlivými kroky omývány v PBS, po dokončení barvení byly dvakrát omyty v PBS. Buněčné preparáty byly snímány na konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 5 DUO při vlnových délkách: λ_{exc} = 488 a 560 nm a λ_{em} = 505–550 nm a 575–650 nm pro DiOC6(3) respektive PI. Plochy buněk na nosičích byly analyzovány pomocí programu ImageJ ze snímků stejné velikosti. Z měření byl stanoven medián plochy jedné buňky na nosič a vyneseno do grafu.

4.8.2 Vizualizace cytoskeletu

Vzorky byly 7. den opláchnuty od média pomocí PBS, fixovány roztokem formaldehydu (3,7% (v/v), 20 minut, RT) a poté inkubovány 2 minuty s 0,5% (v/v) roztokem Triton X-100 pro odstranění buněčných membrán. Promyty 3x PBS. Aktinový cytoskelet buněk byl vizualizován pomocí Phalloidinu s konjugovaným rhodaminem (1:100 v 0,5% BSA, 60 minut, RT, ve tmě). Promyty 3x PBS. Jádra buněk byla následně barvena pomocí interkalačního činidla Hoechst 33342 (v koncentraci 0,4 mg/ml, 15 minut, RT, ve tmě).

V posledním kroku byly vzorky třikrát propláchnuty PBS a následně pozorovány na konfokálním mikroskopu. Všechny výše zmíněné roztoky byly předem naředěny v PBS.

4.9 Statistická analýza

Výsledky analýz byly evaluovány statisticky pomocí programu Graph PadPrism. Kolmogorovův Smirnovův test byl použit k testování normality dat. Data s normálním rozložením byla testována pomocí One way ANOVA testu a Turkeyho test byl použit pro post analýzu. Na data, která neměla normální rozložení ani po transformaci pomocí logaritmu, byl použit Kruskal-Wallisův test a pro post analýzu Dunnové metoda.

Data s normálním rozložením jsou prezentována jako průměrná hodnota a směrodatné odchylky, data bez normálního rozložení pomocí mediánu v krabicovém grafu s fousky. Hladina signifikance byla stanovena na 0,05.

5 Výsledky

Cílem práce bylo navržení nanovláken, které by mohly sloužit jako buněčné nosiče v terapii vitiliga. Ve spolupráci s Laboratoří biomedicíny UCEEB (Univerzitní centrum energeticky efektivních budov) byla elektrostatickým zvlákňováním připravena nanovláknina z PVA.

Materiály připravené z PVA jsou vhodné pro biologické aplikace, ale jejich nevýhodou je až příliš vysoká hydrofilnost. Pro mírné zvýšení hydrofobnosti jsme využili modifikaci studeným CH_4 plazmatem, kterou jsme provedli na spolupracujícím pracovišti Katedry materiálů na Technické univerzitě v Liberci. Předpokládali jsme, že hydroxylové skupiny PVA budou nahrazeny hydrofobními uhlovodíkovými zbytky, čímž dojde k snížení povrchové energie nosičů, a tím k zlepšení adheze a viability buněk na PVA nanovlákninách.








Sledovali jsme vliv CH_4 plazmatické modifikace na morfologie PVA nanovláken vyrobených metodou elektrostatického zvlákňování, změny v chemii povrchu, smáčivosti a povrchového Zeta potenciálu vzorků. V rámci buněčných testů jsme zjišťovali, zda a jaký vliv má na buňky modifikace nosičů studeným metanovým plazmatem v porovnání s nemodifikovanou kontrolou. Pro *in vitro* testování jsme použili myší linie keratinocytů (XB2) a melanocytů (Melan-a).

5.1 Plazmatická modifikace

Plazmatickou úpravu PVA nanovláken jsme realizovali na spolupracujícím pracovišti Katedry materiálů na Technické univerzitě v Liberci za pomoci odborného pracovníka Ing. Lukáše Voleského.

Z výsledků je zřejmé, že plazmatická modifikace studeným CH_4 plazmatem má vliv na zbarvení vzorků (Obr. č. 11). Čím déle byly vzorky vystaveny působení plazmatu, tím více jsou hnědé. Změna barvy je způsobena depozicí metanu, respektive $-\text{CH}_3$ skupin, na PVA nanovláknina. Vzorky PVA1,4 a 2,5 a 3,6 se z hlediska barvy významně neliší, míra průtoku plynu do plazmatické komory má zřejmě větší vliv na depozici uhlíku, než zdvojnásobení času modifikace. To dokazují i výsledky obsahu uhlíku a kyslíku zjištěné XPS analýzou (viz oddíl Rentgenová fotoelektronová spektroskopie). Nejvýznamnějším činitelem depozice uhlíku na materiál je však tlak v komoře, který ovlivňuje množství a formu krystalů (uhlíkové, nebo diamantové), které se utváří na modifikovaném povrchu. Dále napětí zdroje,

které určuje míru zabudování uhlíku do struktury materiálu, jinými slovy, čím je napětí vyšší, tím více do hloubky se materiál modifikuje.

Vzorek	Změna barvy	Průtok plynu [sccm]	Čas [min]
PVAN		0	0
PVA1		15	5
PVA2		10	5
PVA3		5	5
PVA4		15	2,5
PVA5		10	2,5
PVA6		5	2,5

Obrázek č. 11 : Makroskopické srovnání barvy PVA nosičů bez úpravy a po modifikaci metanovým plazmatem, při konstantním záporném napětí 300 V a tlaku 30 Pa v plazmatické komoře. Modifikované vzorky (PVA1-6), nemodifikovaný vzorek (PVAN).

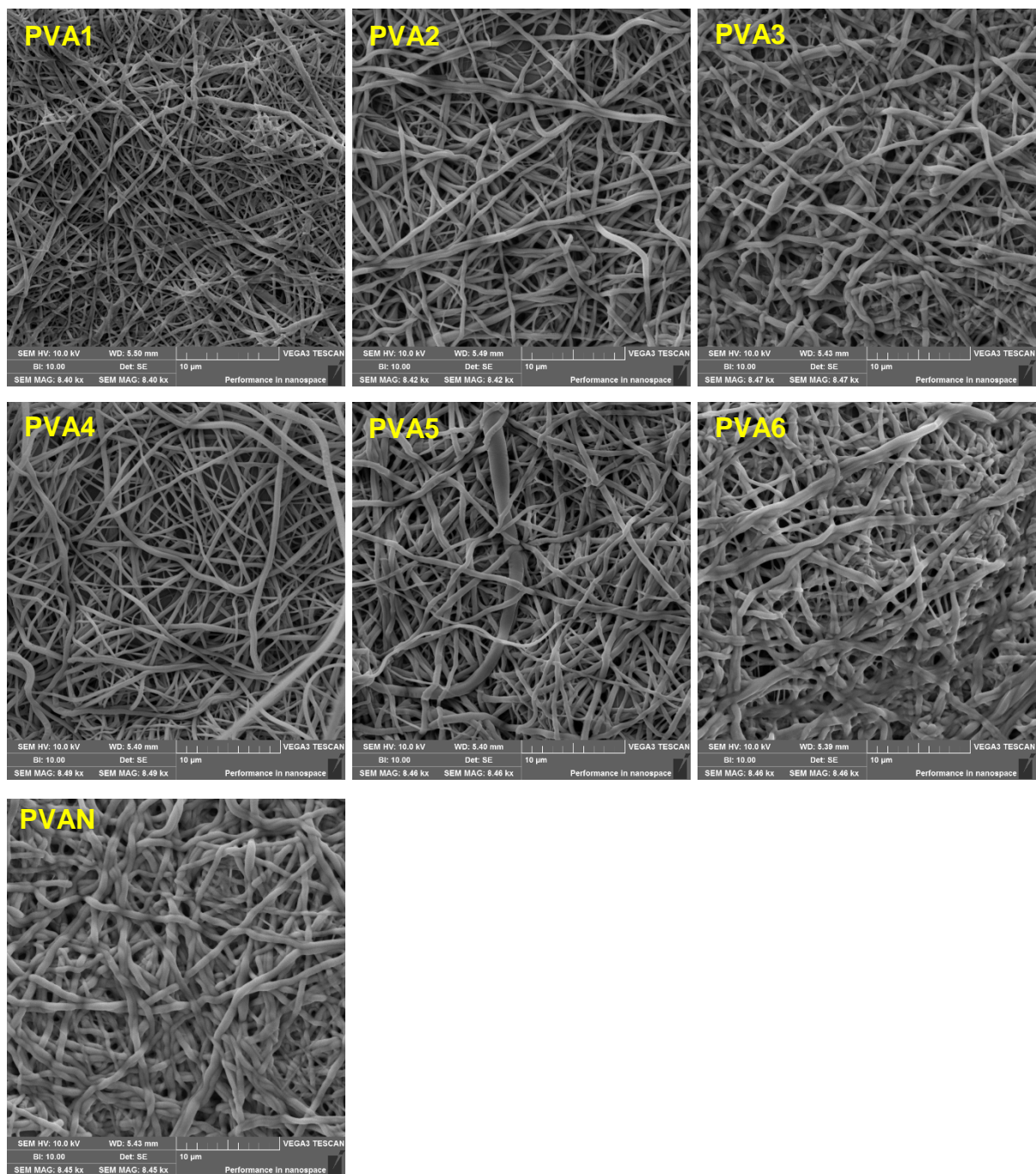
5.2 Analýza chemie povrchu a struktury nanovláken

5.2.1 SEM analýza vláken

V programu ImageJ byl analyzován průměr vláken ze SEM snímků. Průměrná hodnota byla vypočítána z minimálně 100 měření jednotlivých vláken na 2 snímcích od každého vzorku, z naměřených hodnot byl vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka (Tabulka č 4, Obr. č. 12).

Jak je vidět na snímcích ze SEM vlákna vzorků nejsou zcela homogenní (Obr. č 12). V nosiči se objevují jak široká, tak velmi tenká vlákna, o čemž vypovídá i velká směrodatná odchylka v měření. Největší průměr vláken byl naměřen u nemodifikovaného vzorku a to 481,39 nm, nejtenčí vlákna s šířkou 255,89 nm byla zaznamenána u nejvíce modifikovaného vzorku PVA1. Přesto, že vzorky byly po sterilizaci uchovávány v exikátoru a vzdušné vlhkosti vystavovány jen minimálně, nemodifikované PVA bylo nabobtnalé, tudíž průměr vláken byl širší a díky tomu se zmenšili i póry mezi vlákny (Tabulka č. 4).

Při detailním prozkoumání snímků povrchu modifikovaných nosičů byly viditelné změny v hladkosti povrchu a výskyt výstupků na některých vláknech. Důležitým poznatkem analýzy byla skutečnost, že u všech vzorků zůstala zachována vlákenná struktura i po modifikaci CH₄ plazmatem a PVA vrstvy nebyly narušeny.

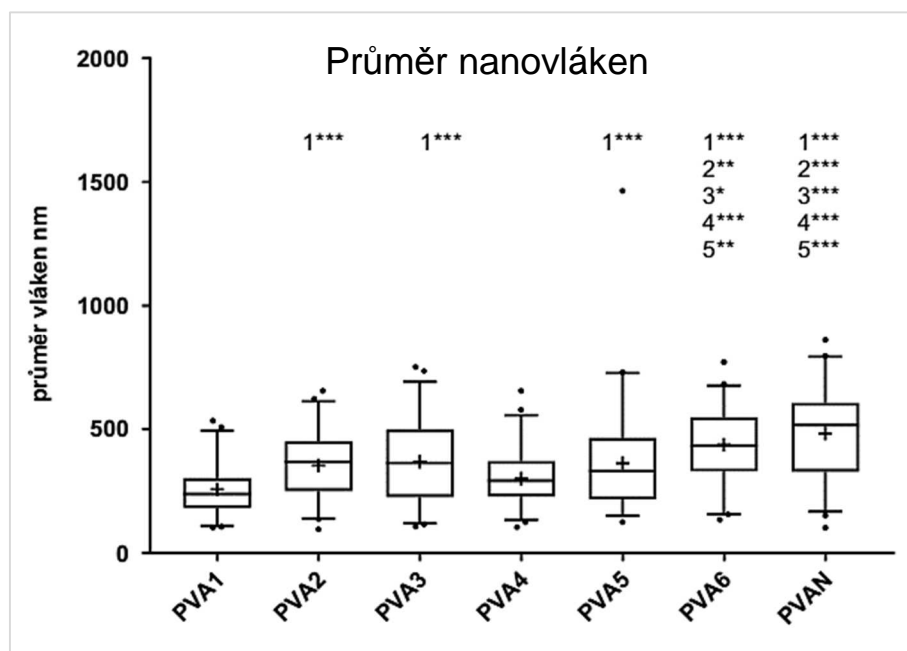


Obrázek č. 12 : Snímky pořízené SEM pro srovnání morfologie vláken PVA nosičů bez úpravy (PVAN) a po modifikaci studeným metanovým plazmatem (PVA1-6), měřítko 10 µm, zvětšení viz dolní hrana snímků 8400-8490x.

Z tabulky č. 4 a grafu (Obr. č. 13) vyplývá, že modifikace PVA nanovláken CH_4 plazmatem snižuje absorpci vzdušné vlhkosti vlákny a tím brání ve změnách jejich morfologie, respektive průměru. Signifikantně menší průměr vláken v porovnání s nemodifikovanou kontrolou PVAN byl sledován u všech modifikovaných vzorků, kromě nejméně modifikovaného PVA6. Nejmenší průměr vykazovali vlákna na nejvíce modifikovaných vzorcích PVA1 a PVA4.

Tabulka č. 4 : Souhrnná tabulka analýzy chemie povrchu a změny průměru PVA nanovláken po modifikaci studeným metanovým plazmatem v porovnání s nemodifikovaným vzorkem (PVAN), směrodatná odchylka (SD), Zeta potenciál povrchu (ζ).

Vzorek	Průtok plynu [sccm]	Čas [min]	Kontaktní úhel (°)	SD \pm (°)	ζ (mV)	Průměr vláken [nm]		
						Průměr	Medián	SD \pm
PVA 1	15	5	129,4	6	-17,1	257	238	98
PVA 2	10	5	95,4	4	-22,6	353	368	125
PVA 3	5	5	88,1	2	-27,5	368	363	160
PVA 4	15	2,5	123,1	3	-30,7	300	292	106
PVA 5	10	2,5	122,4	5	-36	363	330	185
PVA 6	5	2,5	75,1	3	-40,2	437	432	144
PVA N	0	0	49,5	4	-55,4	482	516	179



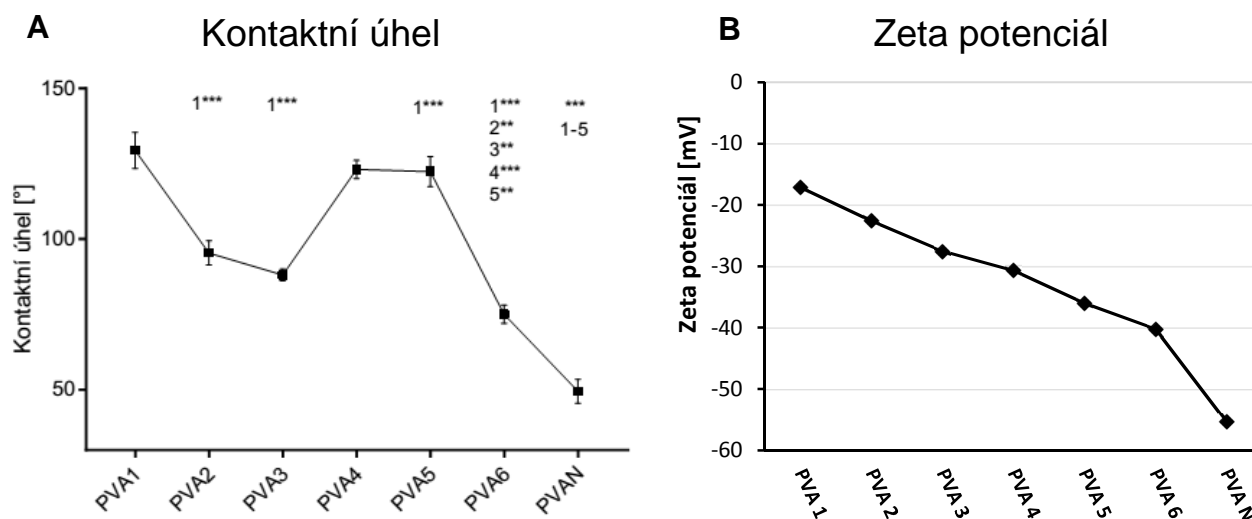
Obrázek č. 13 : Průměr vláken (nm) upravených studeným CH_4 plazmatem. U všech vzorků bylo použito napětí 300 V a tlak 30 Pa, PVA1-působení 5 minut/průtok plynu 15 sccm; PVA2-5 min/10 sccm; PVA3-5 min/5 sccm; PVA4-2,5 min/15 sccm; PVA5-2,5 min/10 sccm; PVA6-2,5 min/5 sccm; PVAN-bez modifikace. Hodnota P znázorněna (***<0,001, **<0,01, *<0,05).

5.2.2 Smáčivost povrchu nanovláken (kontaktní úhel)

Kontaktní úhel byl změřen kapkovou metodou u 6 vzorků plazmaticky modifikovaného PVA (vzorek PVA1-6) lišící se intenzitou plazmování a také u jednoho vzorku nemodifikovaného PVA (vzorek PVAN). Každý vzorek byl změřen desetkrát a následně byl vypočten aritmetický průměr (Tabulka č. 4).

Na základě naměřených hodnot kontaktního úhlu byl podle očekávání nejvíce hydrofilní vzorek bez modifikace PVAN (49,5°). Vzorek PVA3 (88,1°) a vzorek PVA6 (75,1°) jsou velmi slabě hydrofilní. Vzorek PVA2 (95,4°) je slabě hydrofobní. Následně hydrofobnost povrchu stoupá u vzorku PVA5 (122,4°), PVA4 (123,4°) a PVA1 (129,4°), které se jeví jako nejvíce hydrofobní. Z výsledků měření kontaktního úhlu studovaných nosičů vyplývá, že modifikace povrchu CH₄ plazmatem vede ke snížení hydrofilnosti PVA nanovláken nebo k vytvoření hydrofobního povrchu. Změnu povrchové kontaktního úhlu po úpravě jejich povrchu CH₄ plazmatem popisuje graf (Obr. č. 14A).

Množství deponovaných částic bylo ovlivněno jak průtokem plynu, tak dobou aplikace CH₄ plazmatu. Již při ošetření povrchu nanovláken po dobu 2,5 min a nejnižším průtoku plynu do komory bylo dosaženo zvýšení kontaktního úhlu téměř o polovinu původní hodnoty, tedy o 25°. Se zvyšujícím se průtokem plynu CH₄ plazmatu roste i hodnota kontaktního úhlu. Z výsledků porovnání vzorků PVA1,4 a PVA3, 6 soudíme, že větší vliv na změnu této fyzikální hodnoty má průtok plynu než dvojnásobný čas aplikace. Statisticky významný rozdíl v hodnotách kontaktního úhlu byl sledován při vzájemném porovnání vzorků, vyneseno v grafu níže (Obr. č. 14A)



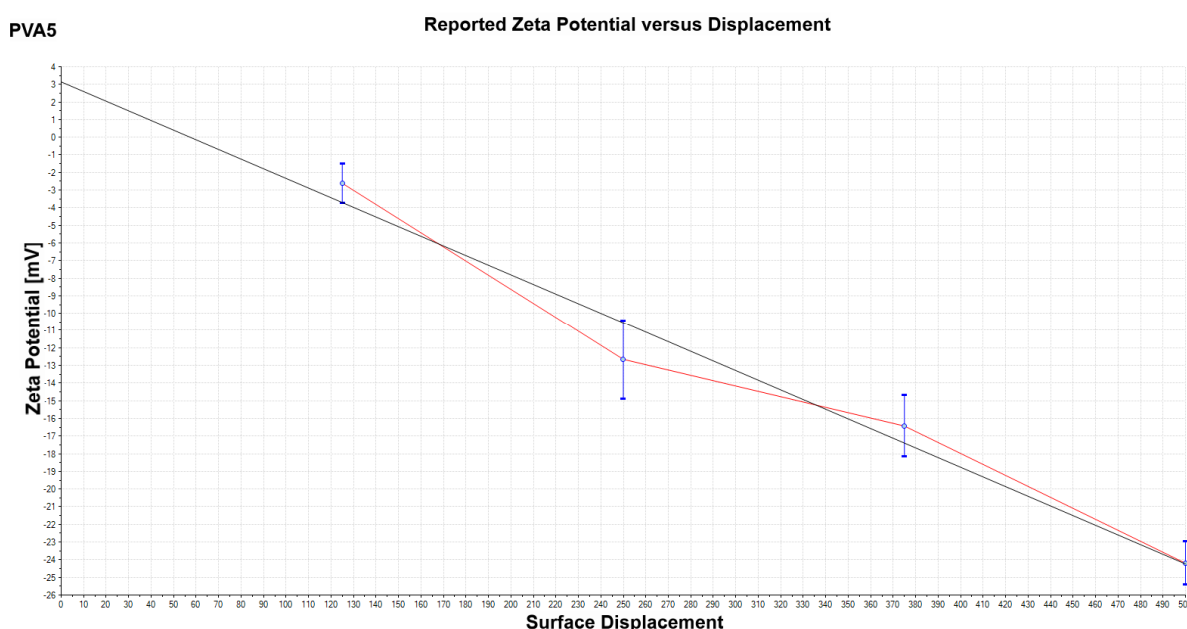
Obrázek č. 14 : **A)** Kontaktní úhel vzorků, hodnota *P* znázorněna (***<0,001, **<0,01). **B)** Zeta potenciál vzorků PVA nanovláken upravených CH₄ plazmatem (PVA1-maximální modifikace, PVA6-minimální modifikace) a bez modifikace (PVAN).

5.2.3 Měření Zeta potenciálu (ζ)

Zeta potenciál všech vzorků byl stanoven na základě měření přístrojem ZetaSizer ZS, hodnoty aritmetických průměrů byly vyneseny do grafu (Obr. č.14B). Nejnižší hodnota Zeta potenciálu povrchu byla naměřena u nemodifikovaného vzorku a to -55,4 mV. Z grafu

(Obr. č.14B) je jasně viditelný trend, rostoucí hodnoty ζ PVA nosiče v závislosti na míře plazmatické modifikace. PVA1 jakožto nejvíce modifikovaný vzorek má hodnotu -17,1 mV a s klesajícím průtokem plynu do komory PVA2 (10sccm) a PVA3 (5sccm) se snižuje i hodnota ζ . Stejně tak je tomu u vzorků PVA4-6. Z grafu je také patrné, že i mírná modifikace, kterou představuje vystavení nanovláken metanovému plazmatu po dobu 2,5 min při nejnižším možném průtoku plynu do komory (5sccm), způsobí výraznou změnu Zeta potenciálu povrchu. Na grafu (Obr. č. 15) je viditelné, jak se vyvíjí hodnoty během měření Zeta potenciálu povrchu nosiče PVA5 v závislosti na vzdálenosti hladiny měření od vzorku.

Výsledkem použité plazmatické modifikace CH_4 plazmatem je snížení povrchové energie a zvýšení Zeta potenciálu povrchu PVA nosičů, které se po modifikaci metanovým plazmatem stávají hydrofobnějšími (Obr. č. 14 a Tabulka č. 4).



Obrázek č. 15 : Ukázka výsledného grafu měření Zeta potenciálu povrchu vzorku PVA5, měřeno přístrojem ZetaSizer ZS. Zeta potenciál versus posun, Osa x představuje zeta potenciál [mV], osa y vzdálenost od vzorku [μm].

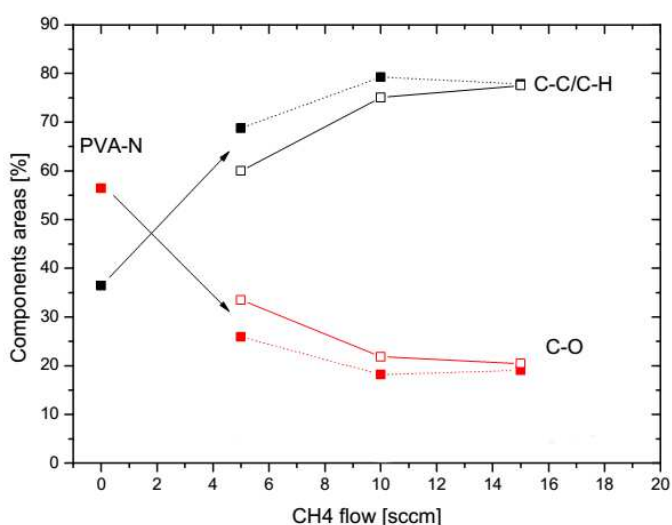
5.2.4 Rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS)

XPS analýza byla provedena na oddělení experimentální fyziky Univerzity J. E Purkyně v Ústí nad Labem, doc. Ing. Martinem Kormundou, Ph.D. Z výsledků vyplývá, že modifikace studeným CH_4 plazmatem zásadně mění chemii povrchu nanovláken. Jak je vidět v tabulce č. 5 modifikace nanovláken CH_4 plazmatem má za následek poklesl obsahu kyslíku na povrchu PVA nanovláken. S rostoucím průtokem CH_4 do plazmatické komory se snižuje množství C-O vazeb a roste poměr C-C/C-H vazeb na povrchu nosičů (Obr. č. 16).

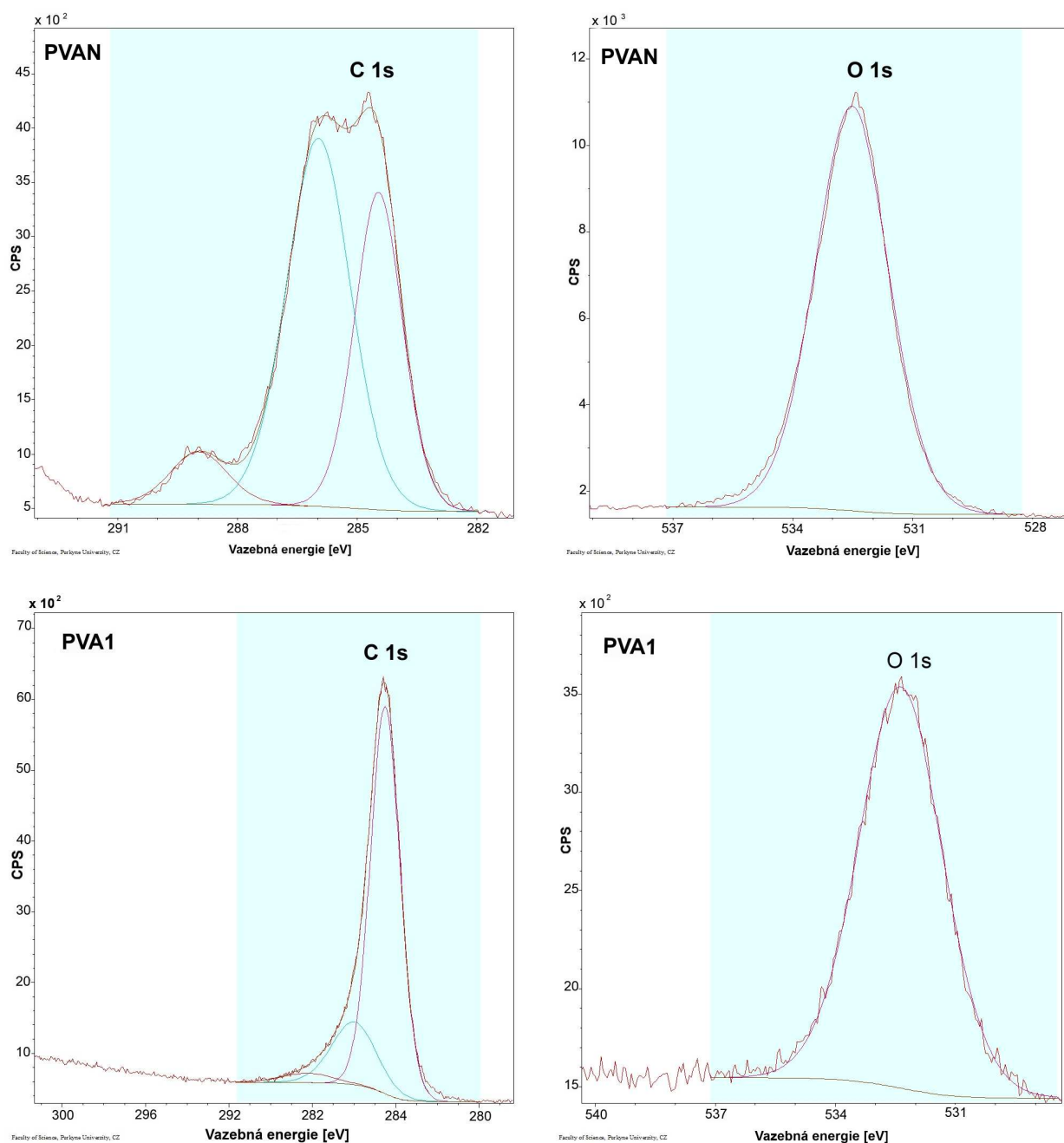
Neupravená vlákna PVAN vykazovala přítomnost C 1s a O 1s spekter dle očekávání, ale také kontaminace v podobě malého množství fosforu (P 2p 2,88) a rezidua draslíku (K 2p 0,97). Zatímco modifikované nosiče PVA-2,3,4,5,6, v malém množství dusík (N 1s). Modifikované vzorky PVA obsahovali v závislosti na průtoku plynu a aplikaci plazmatu větší množství uhlíku a nižší procenta kyslíku v porovnání s nemodifikovaným vzorkem PVAN (Obr. č 16., Tabulka č. 5). U PVAN je poměr kyslíku a uhlíku zhruba 2:1, což odpovídá jeho chemickému složení. Mírně zvýšený obsah kyslíku je způsoben přítomností skupiny COOR na koncích polymerního řetězce. Spektra C 1s a O 1s PVAN vykazují očekávané chování, přičemž C 1s se skládá z vazby C-C (284.5 eV) a C-O (286 eV) v poměru 7/10. Pík O 1s je složen z vazby O-C (532 eV) s možným výskytem slabé druhé vazby při vyšších vazebných energiích. Spektrum C 1s a O 1s vzorku PVAN v porovnání s nejvíce modifikovaným vzorkem PVA1 detailně popisuje Obr. č. 17.

Tabulka č. 5 : Tabulka atomární koncentrace prvků, stanovené XPS měřením. XPS analýza povrchu. C 1s procentuální obsah uhlíku, O 1s kyslíku, P 2p fosforu, N 1s dusíku na povrchu vzorků. U všech vzorků bylo použito napětí 300 mV a tlak 30 Pa, PVAN-bez modifikace.

Vzorek/Prvek	Průtok plynu [sccm]	Čas [min]	C 1s	O 1s	P 2p	N 1s
PVAN	0	0	62,46	33,69	2,88	-
PVA1	15	5	88,49	11,51	-	-
PVA2	10	5	85,50	11,86	0,65	1,99
PVA3	5	5	76,8	18	2,44	2,75
PVA4	15	2,5	86,47	11,89	0,77	0,87
PVA5	10	2,5	85,03	13,24	0,72	1,01
PVA6	5	2,5	71,54	24,47	2,76	1,23



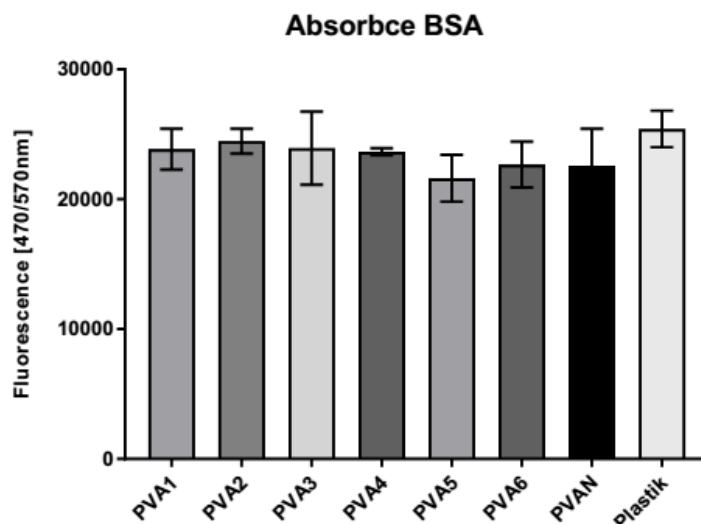
Obrázek č. 16 : XPS analýza vyjadřující změnu v procentuálním zastoupení funkčních skupin na povrchu PVA nanovláken v závislosti na průtoku metanu do plazmatické komory, při jejich modifikaci studeným metanovým plazmatem. Plná čára modifikace po dobu 5 min, přerušovaná 2,5 min.



Obrázek č. 17: Ukázka změny XPS spekter C 1s a O 1s nemodifikovaného vzorku PVAN a nejvíce plazmaticky modifikovaného PVA1.

5.2.5 Absorpce BSA na nanovláknenné nosiče

Pro stanovení míry absorpce BSA na vzorky nanovláken byla změřena fluorescence roztoku s proteinem po inkubaci s PVA vzorky. Jako referenční hodnota sloužil stejný postup na plastiku. Z grafu není jasně viditelný žádný trend ve zvýšené vazbě BSA na vzorky s určitou modifikací CH_4 plazmatem (Obr. č. 18). Ze statistické analýzy vyplývá, že není signifikantní rozdíl v absorpci BSA na čisté PVA a CH_4 plazmatem upravené nosiče.



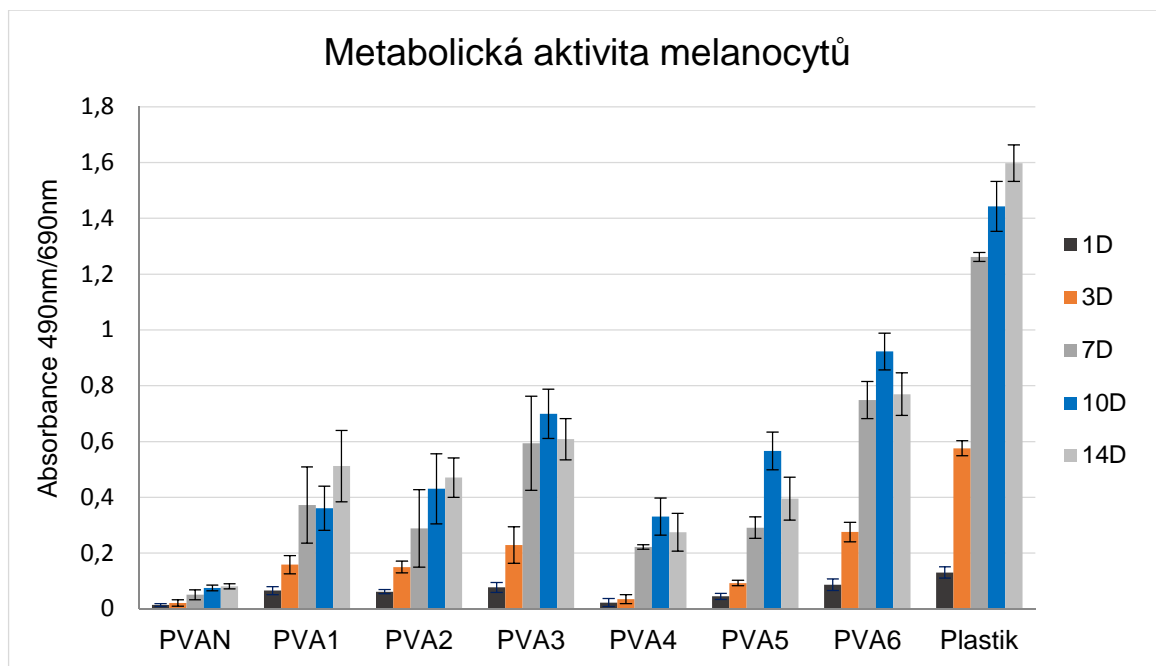
Obrázek č. 18: Míra absorpce referenčního proteinu (BSA) na PVA nosiče, vyjádřená hodnotou fluorescence, která odpovídá množství BSA ve 20 μ l roztoku po absorpci BSA na nosiče. PVA1-maximální modifikace, PVA6-minimální modifikace a bez modifikace (PVAN), jako negativní kontrola byl použit plastik.

5.3 Buněčné testy

5.3.1 Metabolická aktivita buněk (MTS)

Metabolická aktivita buněk na modifikovaných a nemodifikovaných nosičích byla vyhodnocena MTS testem 1., 3., 7., 10. a 14. den pokusu. Do média bylo přidáno MTS činidlo a s tímto roztokem byly v daných testovacích dnech buňky inkubovány. Melanocyty byly inkubovány v 10% CO₂ při 37°C 3 hodiny, keratinocyty ve stejných podmínkách 2 hodiny. Po inkubaci byla měřena absorbance média při 490 nm na spektrofotometru Tecan. Data jsou prezentována jako průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou. Statistické rozdíly mezi vzorky ukazuje z důvodu přehlednosti dat kontingenční tabulka č. 6. Plastik při testování sloužil jako pozitivní kontrola.

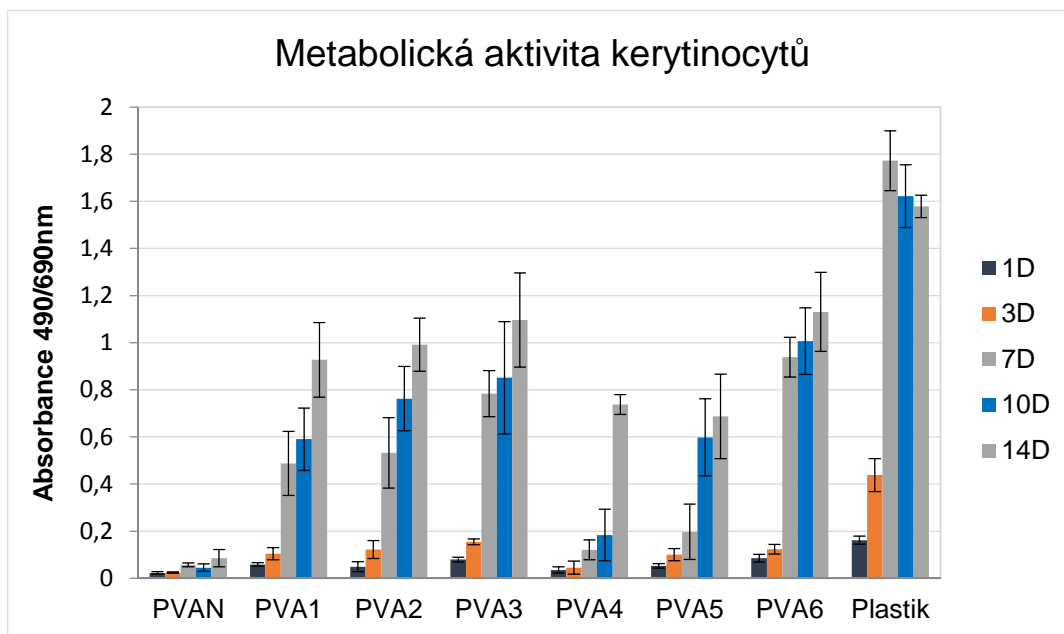
Modifikace CH₄ plazmatem pozitivně ovlivňuje metabolickou aktivitu melanocytů (Obr. č. 19). Výsledky potvrdily, že největší metabolickou aktivitu vykazovaly buňky na modifikovaných vzorcích PVA3 a PVA6 vůči ostatním vzorkům 3., 7., a 10. den kultivace, PVA6 i 14. den. U vzorků PVA3, 4, 5 a 6 byl zaznamenán pokles metabolické aktivity melanocytů 14. den pokusu. V případě hydrofobnějších vzorků PVA1 a PVA2 byl sledován nárůst metabolické aktivity od 1. do 14 dne experimentu, ale s nižší hodnotou absorbance. PVAN vykazovalo nejnižší hodnoty metabolické aktivity ve všech experimentálních dnech.



Obrázek č. 19 : Metabolická aktivita melanocytů (Melan-a) stanovena MTS testem Buňky byly nasazeny na PVA nanovlákně s různou mírou modifikace studeným metanovým plazmatem a plastik (pozitivní kontrola) v hustotě 4400 buněk/nosič . PVA1-maximální modifikace, PVA6-minimální modifikace a PVAN-bez modifikace, D-den.

Tabulka č. 6 : Statistické vyjádření výsledků porovnávající hodnoty MTS testu metabolické aktivity melanocytů na PVA nanovlákněch modifikovaných CH_4 plazmatem. U všech vzorků bylo použito napětí 300 V a tlak 30 Pa. PVA1-působení 5 min/průtok plynu 15 sccm; PVA2-5 min, 10 sccm; PVA3-5 minut/5 sccm; PVA3-2,5 min/15 sccm; PVA4-2,5 min/10 sccm; PVA6-2,5 min/5 sccm; PVAN-bez modifikace. Hodnota P znázorněna (**<0,001, **<0,01, *<0,05).

	1.den								3.den						
Vzorek	PVAN	PVA1	PVA2	PVA3	PVA4	PVA5	PVA6		PVAN	PVA1	PVA2	PVA3	PVA4	PVA5	PVA6
PVA1>	***				**			PVA1>	***				***		
PVA2>	**				*			PVA2>	***				***		
PVA3>	***				***	*		PVA3>	***	*	*		***	***	
PVA4>								PVA4>							
PVA5>								PVA5>	*						
PVA6>	***				***	**		PVA6>	***	***	***		***	***	
	7.den								10.den						
PVA1>	*							PVA1>	***						
PVA2>	*	*						PVA2>	***						
PVA3>	***	*	***		***	***		PVA3>	***	***	***		***		
PVA4>								PVA4>							
PVA5>	*							PVA5>	***	*			**		
PVA6>	***	***	***		***	***		PVA6>	***	***	***	**	***	***	
	14.den														
PVA1>	***				**										
PVA2>	***				**										
PVA3>	***				***	**									
PVA4>	**														
PVA5>	***														
PVA6>	***	***	***	***	***	***									



Obrázek č. 20 : Metabolická aktivita keratinocytů (XB2) stanovena MTS testem. Buňky byly nasazeny na nanovlákněné PVA nosiče s různou mírou modifikace studeným CH_4 plazmatem a plastik (pozitivní kontrola) v hustotě 4000 buněk/nosič. PVA1-maximální modifikace, PVA6-minimální modifikace a PVAN-nemodifikované, D- den experimentu.

První a třetí den kultivace byly v porovnání s neupravenou kontrolou PVAN pozorovány signifikantně vyšší hodnoty metabolické aktivity keratinocytů ve všech modifikovaných vzorcích, kromě PVA4. Stejně tak tomu bylo v případě měření 10. den. Největší nárůst metabolické aktivity buněk byl zaznamenán 7. den kultivace, zejména u vzorků PVA3 a PVA6 v porovnání s hodnotami z 3. dne experimentu. Sedmý den je statisticky významný rozdíl u vzorků PVA1,2,3 a 6 v porovnání s PVAN, PVA4 a PVA5. Poslední den experimentu byla metabolická aktivita keratinocytů na všech modifikovaných vzorcích signifikantně vyšší, než na PVAN a u PVA6 byly vyšší než u ostatních vzorků kromě PVA3. Pozorovali jsme i signifikantní rozdíly absorbance při porovnání všech vzorků mezi sebou, tyto poznatky včetně hladiny signifikance shrnuje kontingenční tabulka č. 7. Plastik sloužil při experimentu jako pozitivní kontrola a v porovnání se všemi vzorky PVA na něm byla metabolická aktivita melanocytů i keratinocytů signifikantně vyšší ($P < 0,001$).

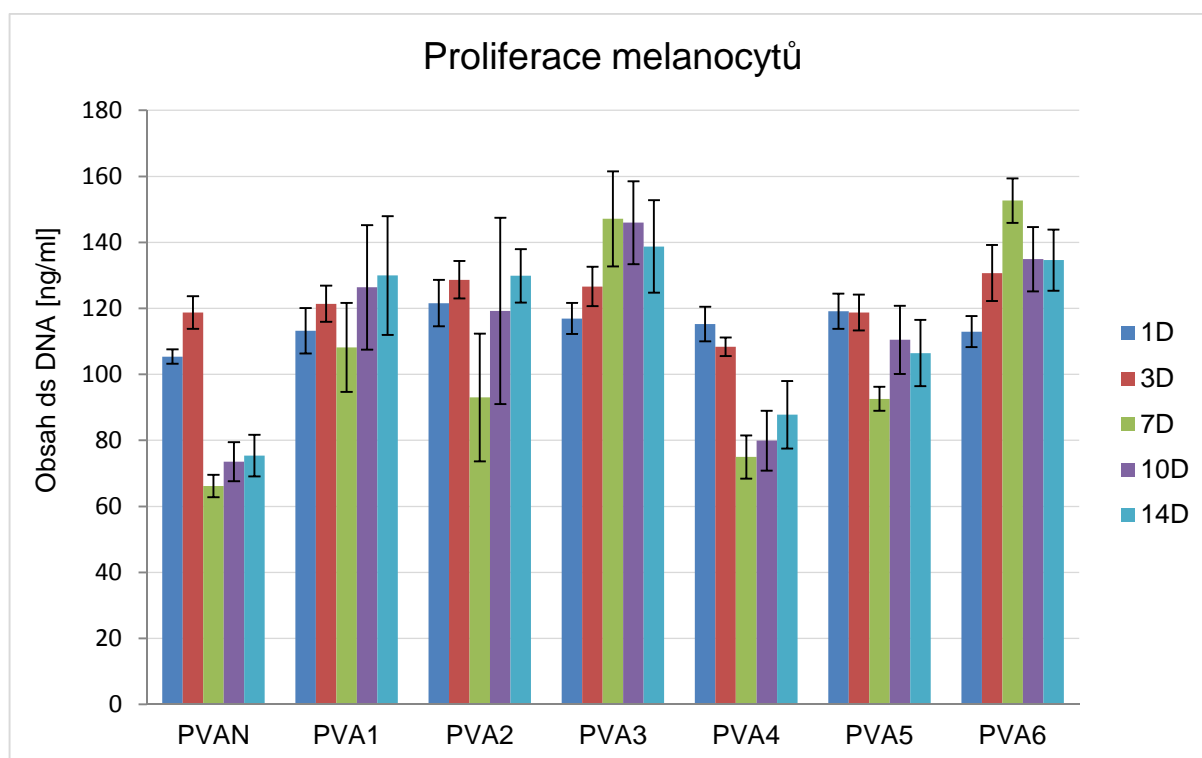
	1.den								3.den						
Vzorek	PVAN	PVA1	PVA2	PVA3	PVA4	PVA5	PVA6	Vzorek	PVAN	PVA1	PVA2	PVA3	PVA4	PVA5	PVA6
PVA1>	*							PVA1>	*						
PVA2>	*							PVA2>	**				*		
PVA3>	***		*		***	*		PVA3>	***				**		
PVA4>								PVA4>							
PVA5>	*							PVA5>	*						
PVA6>	***	*	**		***	*		PVA6>	*						

7.den							10.den						
PVA1>	***				***	**	PVA1>	***				**	
PVA2>	***				***	**	PVA2>	***				***	
PVA3>	***	**	**		***	***	PVA3>	***				***	
PVA4>							PVA4>						
PVA5>							PVA5>	***				***	
PVA6>	***		***		***	***	PVA6>	***	**			***	**
14.den													
PVA1>	***												
PVA2>	***												
PVA3>	***				*	*							
PVA4>	*												
PVA5>	***												
PVA6>	***	*	*		***	***							

Tabulka č. 7 : Statistické vyjádření výsledků porovnávající hodnoty MTS testu metabolické aktivity keratinocytů na PVA nanovláčkách modifikovaných různou intenzitou CH₄ plazmatem. PVA1-maximální modifikace, PVA6-minimální modifikace a PVAN-bez modifikace. Hodnota P znázorněna (***<0,001, **<0,01, *<0,05).

5.3.2 Kvantifikace DNA

Obsah dsDNA na vzorcích použitých pro MTS test byl změřen pomocí metody PicoGreen® (Invitrogen) všechny experimentální dny.



Obrázek č. 21 : Obsah dsDNA melanocytů (Melan-a), stanoveno pomocí PicoGreen® testu 1., 3., 7., 10. a 14. den pokusu vyjadřující míru proliferace Melan-a na nosičích. Buňky byly nasazeny na nanovláčkové PVA nosiče s různou mírou modifikace studeným metanovým plazmatem v hustotě 4400 buněk/nosič. PVA1-maximální modifikace, PVA6-minimální modifikace, PVAN-bez modifikace, D-den experimentu.

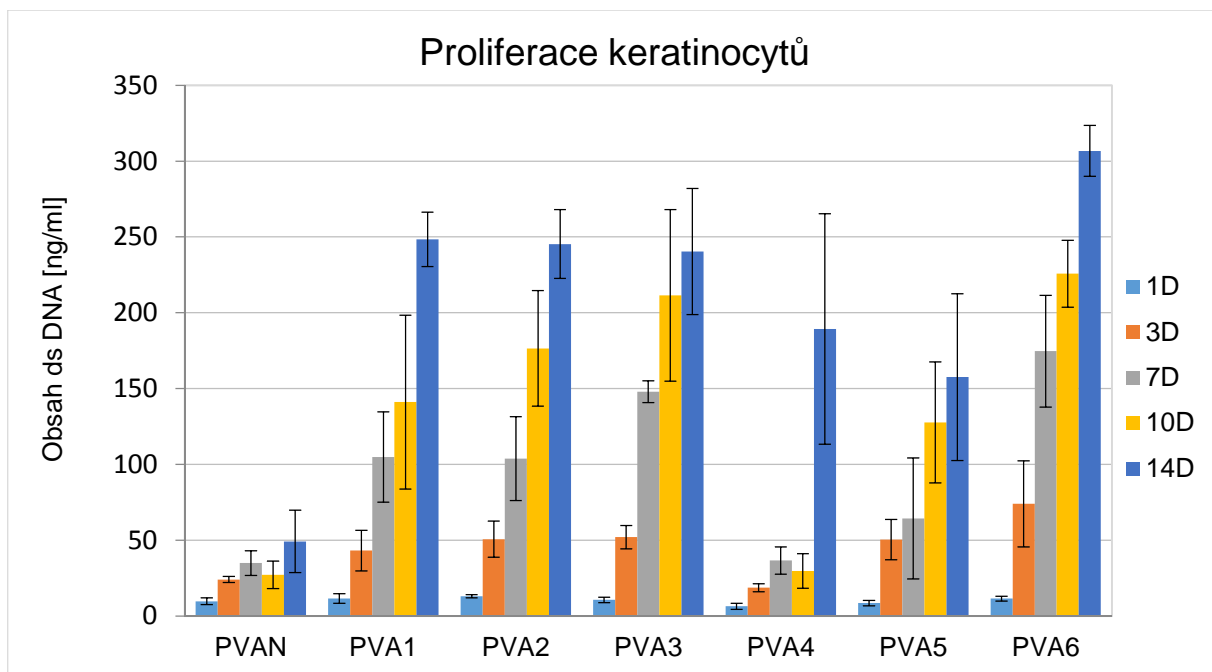
Buňky na nemodifikovaném PVA vykazovaly do 3. dne kultivace proliferační aktivitu, která v dalších dnech výrazně klesla. Stejně tak tomu bylo u vzorků PVA1, 2, 4, a 5. Nejvyšší obsah dsDNA byl naměřen 7. den kultivace u vzorků PVA3 a 6. další experimentální den už

byl u těchto vzorků zaznamenán pokles proliferace a 14. den kultivace se tato hodnota ještě snížila. I přes tento pokles měly vzorky PVA3 a PVA6 nejlepší hodnoty proliferace melanocytů od 7. do 14. dne experimentu. U všech vzorků, kde byl zaznamenán úbytek dsDNA v polovině experimentu, melanocyty vykazovali v dalších dnech opět rostoucí proliferální aktivitu (Obr. č 21).

*Tabulka č. 8 : Statistické vyjádření výsledků porovnávající hodnoty obsahu dsDNA melanocytů kultivovaných na PVA nanovlákních modifikovaných CH₄ plazmatem. Kvantifikace dsDNA stanovena pomocí PicoGreen® testu. U všech vzorků bylo použito napětí 300 V a tlak 30 Pa. PVA1-působení 5 min/průtok plynu 15 sccm; PVA2-5 min/10 sccm; PVA3-5 minut/5 sccm; PVA4-2,5 min/15 sccm; PVA5-2,5 min/10 sccm; PVA6-2,5 min/5 sccm; PVAN-bez modifikace. Hodnota P znázorněna (**<0,001, **<0,01, *<0,05).*

1.den								3.den							
	PVAN	PVA1	PVA2	PVA3	PVA4	PVA5	PVA6		PVAN	PVA1	PVA2	PVA3	PVA4	PVA5	PVA6
PVA1>	**							PVA1>							
PVA2>								PVA2>					*		
PVA3>	*							PVA3>					*		
PVA4>								PVA4>							
PVA5>	**							PVA5>					**		
PVA6>								PVA6>							
7.den								10.den							
PVA1>	***				**			PVA1>	**				**		
PVA2>	*							PVA2>	**				*		
PVA3>	***	***	***		***	***		PVA3>	***	*	**		***	*	
PVA4>								PVA4>							
PVA5>	*							PVA5>	***				**		
PVA6>	***	***	***		***	***		PVA6>	***					***	
14.den															
PVA1>	***				***										
PVA2>	***				***	*									
PVA3>	***				***	***									
PVA4>															
PVA5>	***				***										
PVA6>	***				***	**									

Na nemodifikovaném vzorku (PVAN) byly naměřeny nejnižší hodnoty proliferální aktivity keratinocytů v průběhu celého experimentu. Srovnatelné hodnoty byly sledovány u vzorku PVA4 kromě 14. experimentálního dne, kdy byl zaznamenán nárůst obsahu dsDNA. Na modifikovaných PVA nanovlákních buňky vykazovaly rostoucí proliferální aktivitu v průběhu celého experimentu. PVA3 a PVA6 vykazovali 7. a 10. den kultivace vyšší obsah dsDNA než PVAN,1,2,4,5. V porovnání PVA6 se všemi ostatními vzorky byla míra proliferace buněk vyšší i 14. den kultivace. V průběhu pokusu byly zaznamenány i signifikantní rozdíly v obsahu dsDNA u jednotlivých skupin nosičů (Tabulka č. 9).



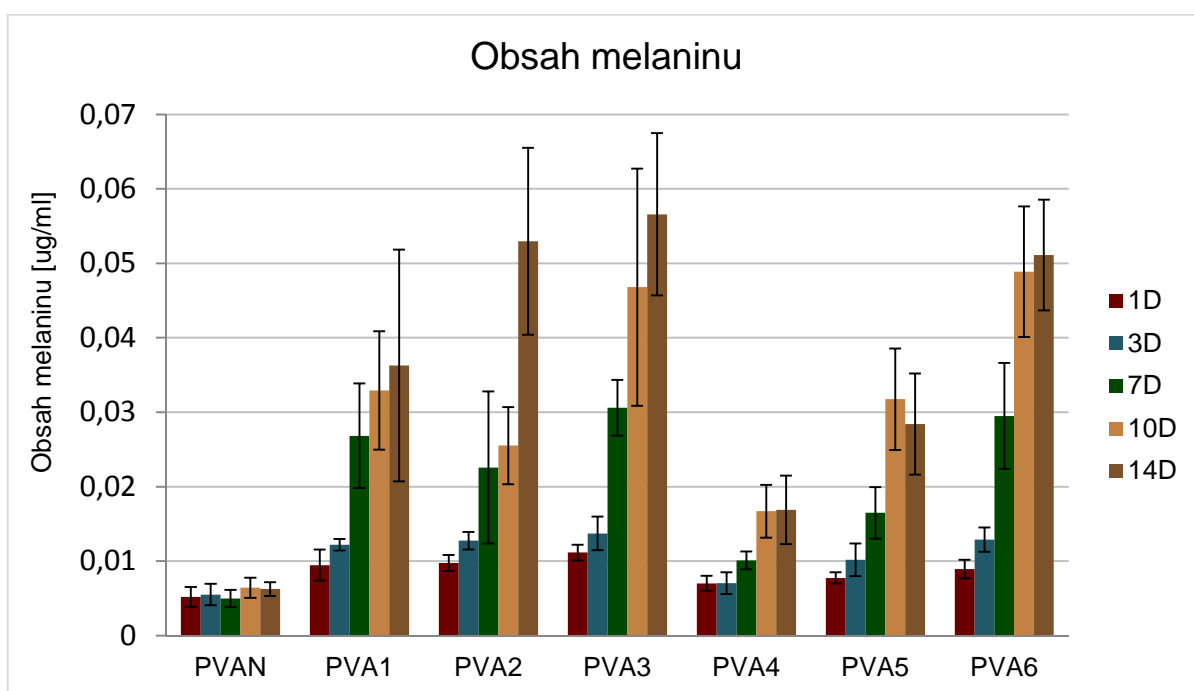
Obrázek č. 22 : Kvantifikace dsDNA keratinocytů (XB2), stanoveno pomocí PicoGreen® testu 1.,3.,7.,10. a 14. den pokusu vyjadřující míru proliferace XB2 na nosičích. Buňky byly nasazeny na nanovlákněné PVA nosiče s různou mírou modifikace studeným metanovým plazmatem v hustotě 4000 buněk/nosič, N-nemodifikované PVA.

Tabulka č. 9 : Statistické vyjádření výsledků porovnávající hodnoty obsahu dsDNA keratinocytů kultivovaných na PVA nanovlákněch modifikovaných CH_4 plazmatem. Kvantifikace DNA stanovena pomocí PicoGreen® testu. U všech vzorků bylo použito napětí 300 V a tlak 30 Pa. PVA1-působení 5 min/průtok plynu 15 sccm; PVA2-5 min/10 sccm; PVA3-5 min/5 sccm; PVA4-2,5 min/15 sccm; PVA5-2,5 min/10 sccm; PVA6-2,5 min/5 sccm; PVAN-bez modifikace. Hodnota P znázorněna (**<0,001, **<0,01, *<0,05).

1.den								3.den							
	PVAN	PVA1	PVA2	PVA3	PVA4	PVA5	PVA6		PVAN	PVA1	PVA2	PVA3	PVA4	PVA5	PVA6
PVA1>			**		**			PVA1>							
PVA2>								PVA2>					*		
PVA3>					*			PVA3>	*				*		
PVA4>								PVA4>							
PVA5>								PVA5>					*		
PVA6>					*			PVA6>	*	*			*		
7.den								10.den							
PVA1>	**				**			PVA1>	**				**		
PVA2>	**				***			PVA2>	***				***		
PVA3>	***				***	**		PVA3>	***				***	*	
PVA4>								PVA4>							
PVA5>								PVA5>	*				**		
PVA6>	***	**	**		***	***		PVA6>	***				***	*	
14.den															
PVA1>	***					*									
PVA2>	***					*									
PVA3>	***														
PVA4>	***														
PVA5>	**														
PVA6>	***				**	***									

5.3.3 Obsah melaninu na PVA nosičích

Obsah melaninu na nosičích byl stanoven na vzorcích použitých pro MTS a PicoGreen. Melanin byl solubilizován inkubací v 0,3M NaOH při 60°C po dobu 6 hodin. Množství melaninu bylo vypočítáno na základě naměřené absorbance při 405 nm na spektrofotometru Tecan. Získané hodnoty absorbance byly přepočteny a data vyjádřena jako procenta obsahu melaninu v daný experimentální den na PVAN (PVAN=100%) (Tabulka č. 10). Trend syntézy melaninu na nosičích modifikovaných CH₄ plazmatem v porovnání s nemodifikovanou PVA kontrolou je znázorněn v grafu (Obr. č. 23).



Obrázek č. 23: Obsah melaninu na CH₄ plazmatem modifikovaných PVA nosičích, stanoveno spektrofotometricky při 405 nm, po solubilizaci 1M NaOH. PVA1-maximální modifikace, PVA6-minimální modifikace, PVAN – bez modifikace.

Tabulka č. 10: Obsah melaninu na modifikovaných nosičích vyjádřen jako procenta obsahu melaninu v daný experimentální den vůči nemodifikované PVA kontrole (PVAN). PVA1-působení modifikace 5 min/průtok plynu 15 sccm; PVA2-5 min/10 sccm; PVA3-5 min/5 sccm; PVA4-2,5 min/15 sccm; PVA5-2,5 min/10 sccm; PVA6-2,5 min/5 sccm při konstantním tlaku 30 Pa a záporném napětí 300 V.

Vzorek	PVA 1	PVA 2	PVA 3	PVA 4	PVA 5	PVA 6
1.den	182,4	188,0	214,9	135,1	149,3	172,1
3.den	222,1	231,6	249,6	127,9	185,0	234,2
7.den	541,1	455,4	617,0	203,7	332,6	595,2
10.den	512,3	397,0	728,1	259,9	494,1	760,6
14.den	611,0	892,6	953,6	284,3	478,7	861,4

Obsah melaninu 1. den pokusu byl na PVAN signifikantně menší v porovnání s modifikovanými vzorky PVA1,2,3 a 6 ($P < 0,001$). Množství melaninu na PVA4 začalo narůstat až od 7. dne kultivace. PVA3 ukázalo vyšší tvorbu melaninu než PVAN a PVA4 celou dobu kultivace a v porovnání s PVA5 1., 3., 7. a 14. den. Podobně na vzorku PVA6 bylo od 7. dne naměřeno druhé největší množství melaninu ze všech vzorků. Nejméně melaninu buňky syntetizovaly na PVAN a PVA4 (Obr. č 23, Tabulka č. 11).

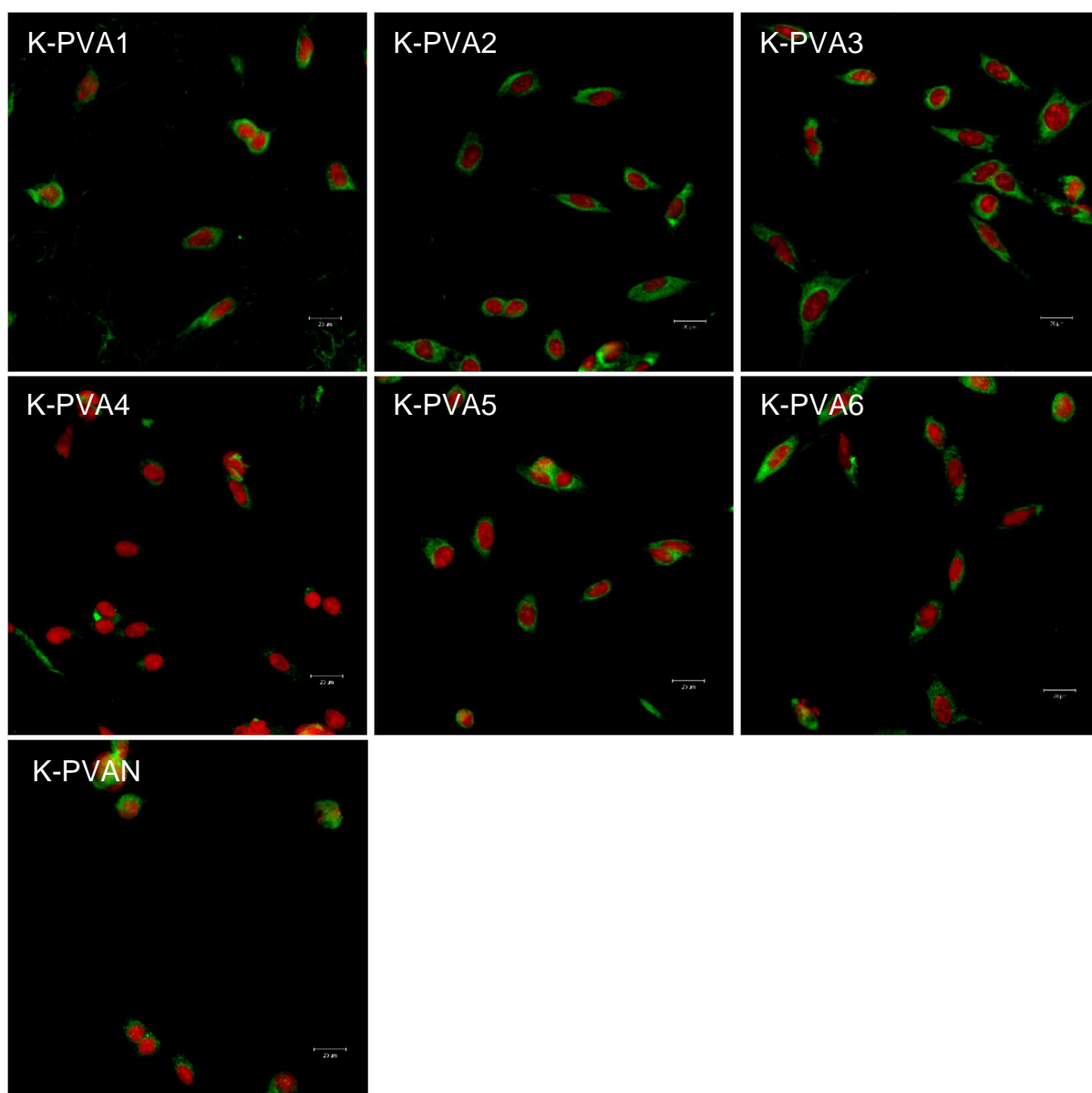
1.den								3.den							
Vzorek	PVAN	PVA1	PVA2	PVA3	PVA4	PVA5	PVA6		PVAN	PVA1	PVA2	PVA3	PVA4	PVA5	PVA6
PVA1>	***							PVA1>	***				***		
PVA2>	***				*			PVA2>	***				***		
PVA3>	***				***	**		PVA3>	***				***	*	
PVA4>								PVA4>							
PVA5>								PVA5>	**						
PVA6>	***							PVA6>	***				***		
7.den								10.den							
PVA1>	***				**			PVA1>	**						
PVA2>	***				*			PVA2>	*						
PVA3>	***				***	*		PVA3>	***		*		***		
PVA4>								PVA4>							
PVA5>								PVA5>	**						
PVA6>	***				***	*		PVA6>	***		**		***	*	
14.den															
PVA1>	**														
PVA2>	***				***	**									
PVA3>	***	*			***	**									
PVA4>															
PVA5>	*														
PVA6>	***				***	*									

Tabulka č. 11: Statistická analýza obsahu melaninu na modifikovaných nosičích CH_4 plazmatem PVA1-6 a nemodifikované kontrole PVAN. Hodnota P znázorněna (*** $<0,001$, ** $<0,01$, * $<0,05$).

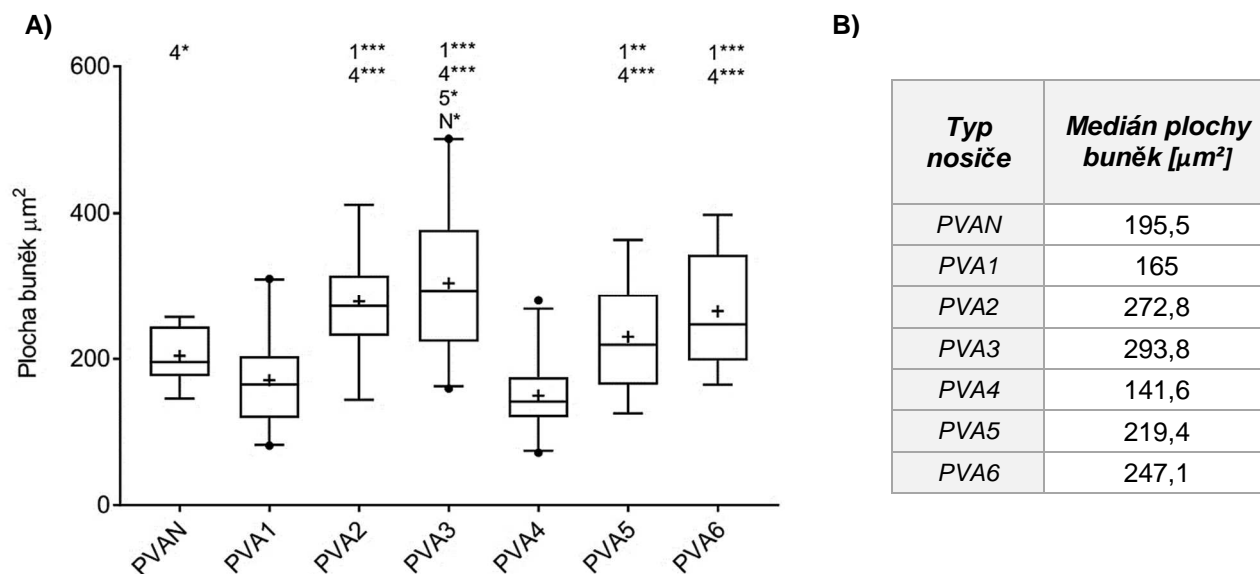
5.4 Fluorescenční konfokální mikroskopie

5.4.1 Adheze buněk na PVA nanovlákná

Adheze melanocytů a keratinocytů byla sledována první den pokusu pomocí fluorescenčního barvení DiOC6(3)/Propidium jodid pomocí konfokálního elektronového mikroskopu. Statisticky významný rozdíl v ploše buněk byl zaznamenán u vzorku PVA3 v porovnání s PVAN, 1, 4 a 5. Adheze keratinocytů na vzorku PVA2, 5 a 6 byla signifikantně lepší než na vzorky PVA1 a PVA4. Nejmenší plocha keratinocytů pak byla naměřena u vzorku PVA4. Rozdíly v rámci jednotlivých vzorků včetně hladiny významnosti jsou znázorněny v grafu (Obr. č 25A).

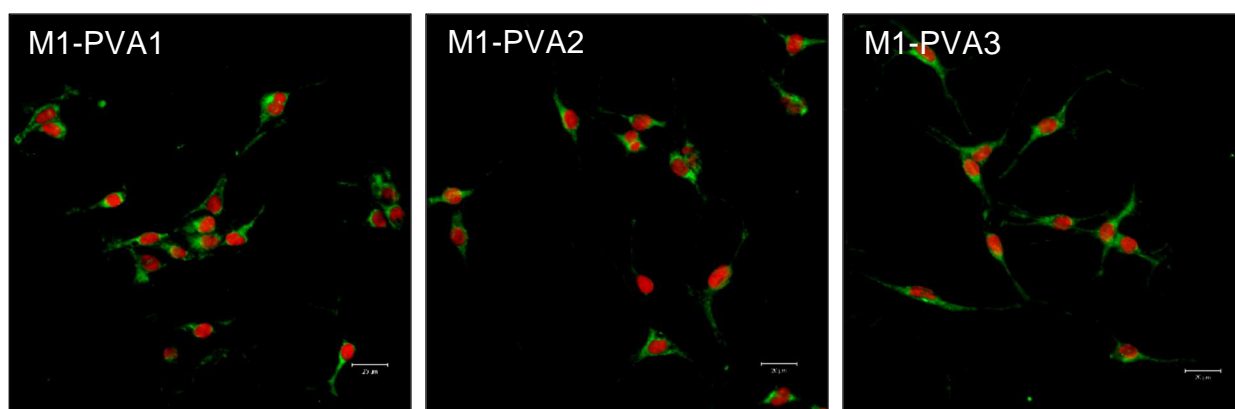


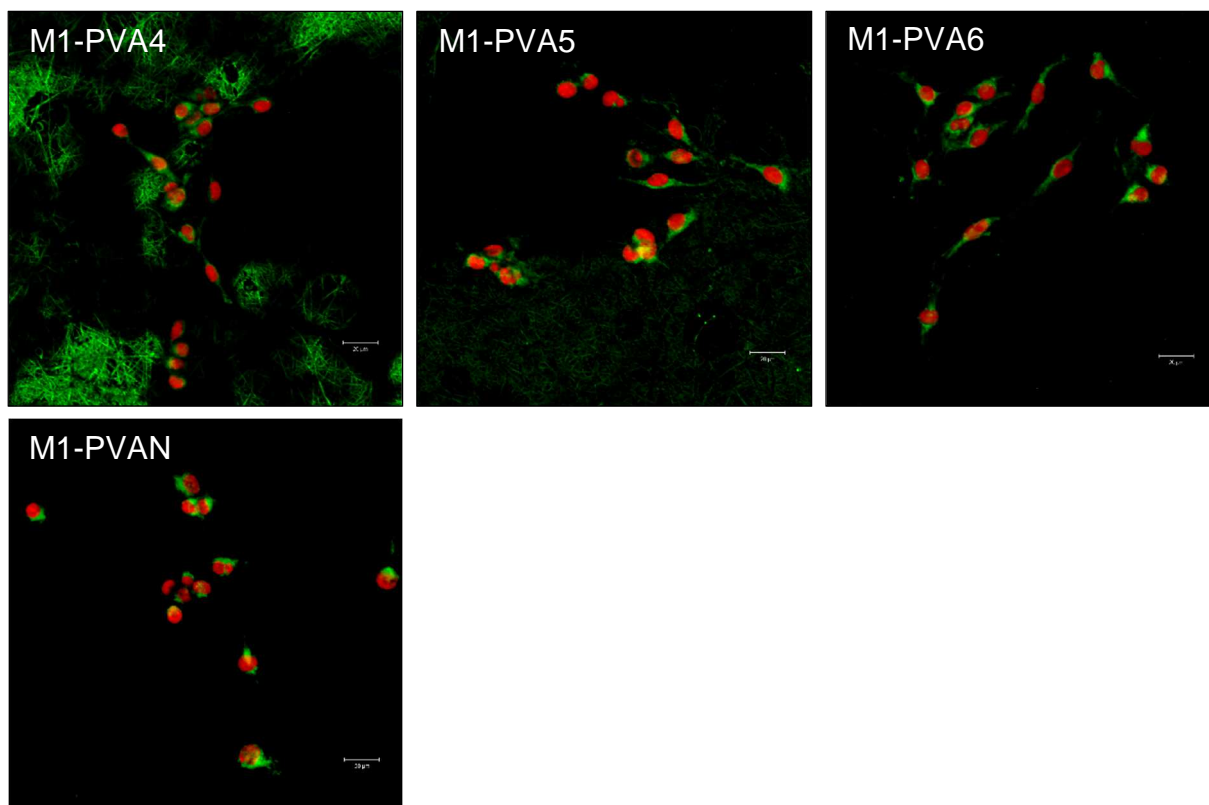
Obrázek č. 24 : Adheze keratinocytů (XB2) na nanovláknenných PVA nosičích modifikovaných metanovým plazmatem 1. den po nasazení. Cytoplasma buněk barvena pomocí DiOC6(3) (zelená), jádra buněk propidium jodidem (červená). PVA1-6 vzorky s rozdílnou modifikací, N nemodifikované PVA, Obj. x20, Zv. x2, měřítko 20 μm , imerzní olej.



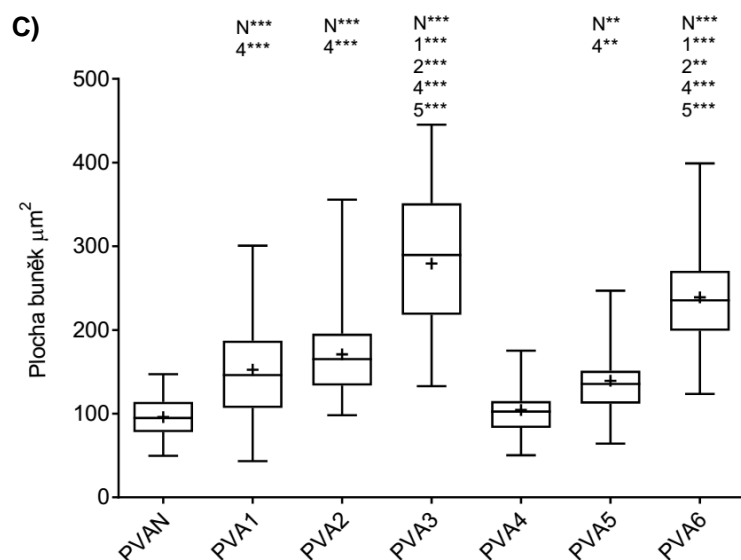
Obrázek č. 25 : **A)** Plocha keratinocytů (XB2) první den po nasazení na PVA nosičích s rozdílnou modifikací studeným metanovým plazmatem (PVA1-6) a nemodifikované kontrole (PVAN), první experimentální den. Hodnota P znázorněna (**< 0,001, *<0,01, *<0,05). **B)** Tabulka adheze keratinocytů na PVA nosiče.

Modifikace PVA nosičů CH_4 plazmatem má pozitivní vliv na adhezi melanocytů, což dokazují snímky pořízené konfokálním mikroskopem první den experimentu (Obr. č. 26). Na nemodifikovaném vzorku PVA mají buňky oválný tvar a malou plochu cytoplasmy (Obr. M1-PVAN). Naopak na snímcích M1-PVA3 a M1-PVA6 vidíme melanocyty kultivované na nosičích modifikovaných plazmatem po dobu 5 min, respektive 2,5 min s průtokem 5 sccm, kde jsou buňky roztažené s typickou hvězdicovitou morfologií. U vzorku PVA4 byla zaznamenána vazba fluorescenčního barviva na nosič, méně pak u vzorku PVA5. Nejvyšší adhezi vykazovaly melanocyty na vzorcích PVA3 a PVA6, což dokazují i signifikantní výsledky statistické analýzy plochy buněk znázorněné v grafu (Obr. č.27C).





Obrázek č. 26: Adheze melanocytů (Melan-a) na PVA nosičích modifikovaných metanovým plazmatem 1. den po nasazení. Cytoplasma buněk barvena pomocí DiOC6(3) (zelená), jádra buněk propidium jodidem (červená). Vzorky PVA1-6, PVAN-nemodifikované PVA, Obj. x20, Zv. x2, měřítko 20 μm , imerzní olej.



D)

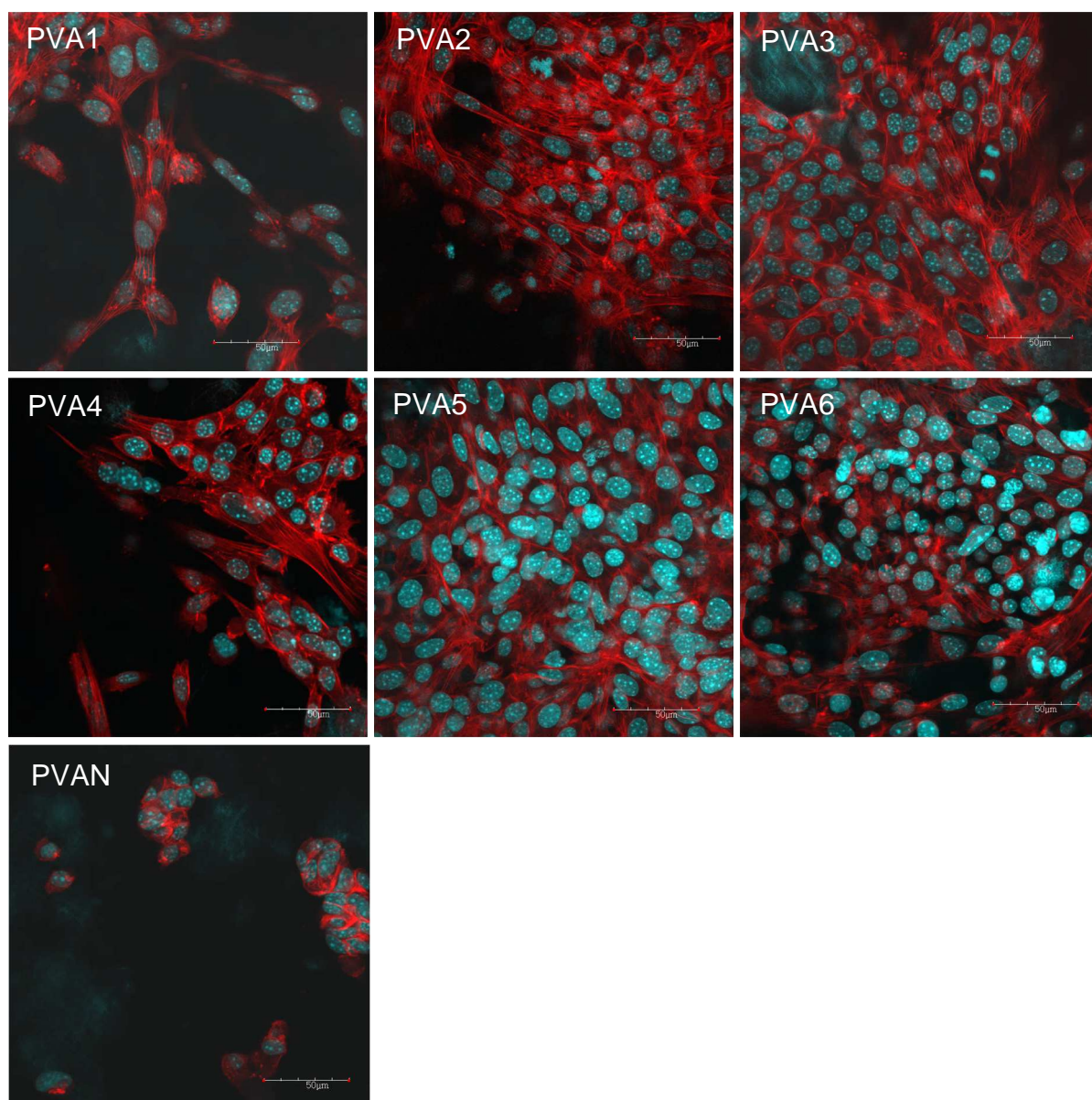
Typ nosiče	Medián plochy buněk [μm^2]
PVAN	94,85
PVA1	146,2
PVA2	165,3
PVA3	289,6
PVA4	102,5
PVA5	135,4
PVA6	235,4

Obrázek č. 27: **C)** Plocha melanocytů (Melan-a) první den po nasazení na PVA nosičích s rozdílnou modifikací studeným metanovým plazmatem (PVA1-6) a nemodifikované kontrole (PVAN), první experimentální den. Hodnota P znázorněna (**< 0,001, **< 0,01). **D)** Tabulka adheze melanocytů.

5.4.2 Vizualizace aktinového cytoskeletu

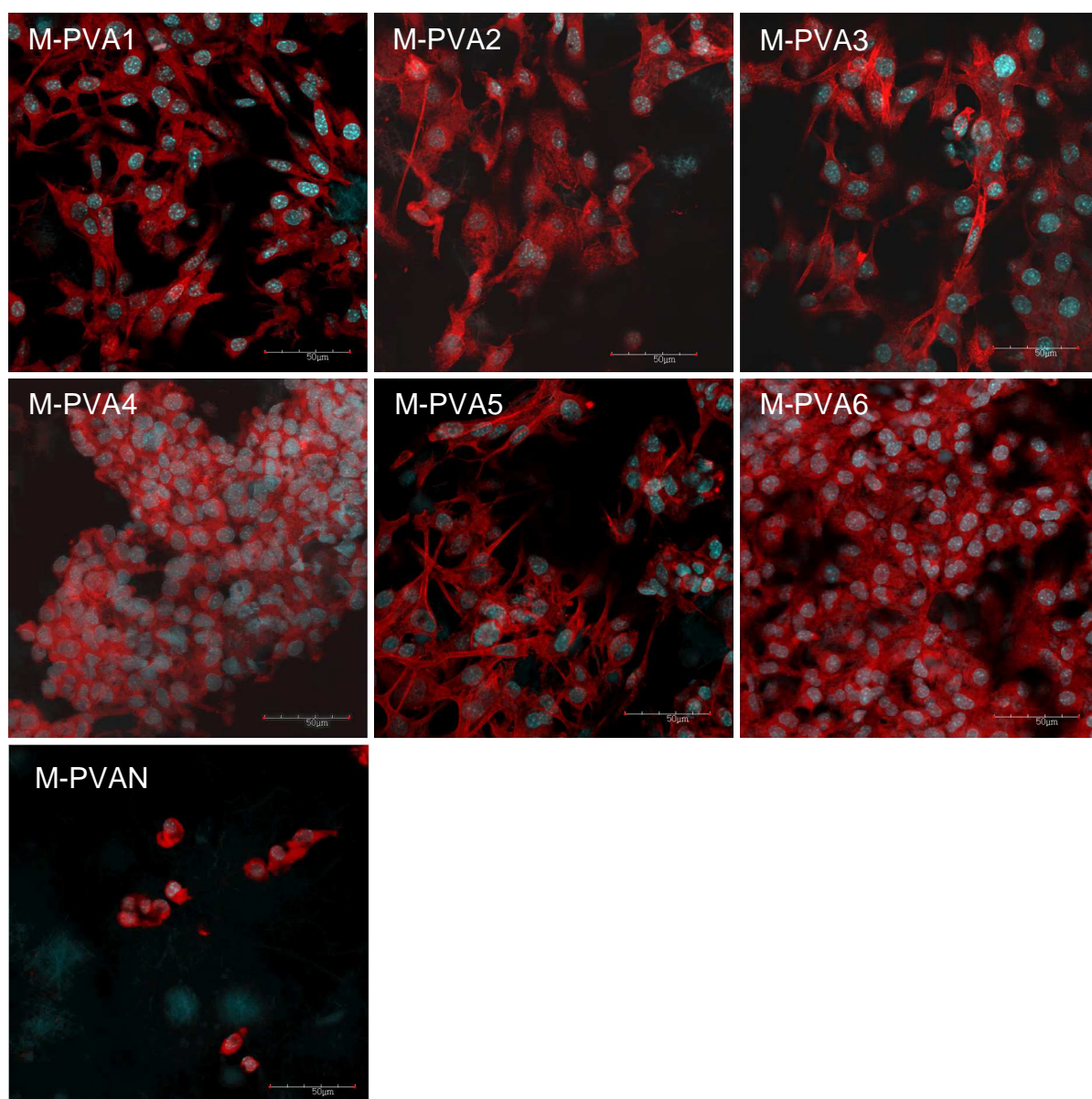
Celková morfologie buněk a aktinový cytoskelet keratinocytů i melanocytů byl vizualizován 7. den pokusu pomocí fluorescenčního barvení Phalloidin/Hoechst na konfokálním mikroskopu s použitím imerzního oleje.

Vizualizace buněk pomocí konfokálního mikroskopu prokázala rozdílnost v morfologii buněk a aktinovém cytoskeletu v závislosti na modifikaci CH₄ plazmatem (Obr. č. 28). Keratinocyty 7. den kultivace na nemodifikovaném PVA měly kulovitý tvar, agregovaly do shluků, nevytvářely filopodia ani stresová vlákna. Červeně značený aktinový cytoskelet byl na PVAN soustředěn pouze okolo jádra. Cytoskelet keratinocytů byl nejlépe vyvinut na vzorcích PVA3 a PVA6, kde je vidět i větší množství buněk v několika vrstvách. Na vzorcích PVA2 a PVA5, jsou buňky dobře rozprostřeny a tvoří souvislou vrstvu buněk s množstvím aktinových filament. Na vzorcích PVA3,4,5 a 6 bylo sedmý den dosaženo konfluentní vrstvy buněk.



Obrázek č. 28 : Vizualizace cytoskeletu keratinocytů (XB2) na PVA nosičích modifikovaných studeným metanovým plazmatem 7. den kultivace. Jádra buněk modře Hoechst, červeně aktinový cytoskelet Phalloidin, PVA1-6 vzorky s rozdílnou modifikací, N nemodifikované PVA, Obj. x10, Zv. x4, měřítko 50 μm, imerzní olej.

Morfologie melanocytů byla rovněž ovlivněna modifikací PVA nanovláken. Jak je vidět na snímcích aktinového cytoskeletu v závislosti na modifikaci CH4 plazmatem (Obr. č. 29). Melanocyty mají na PVAN oválný tvar, vytvářely shluky buněk, nebo se nacházely jednotlivě. Na všech modifikovaných vzorcích, kromě PVA4, jsou naopak melanocyty roztažené s dobře viditelnými cytoskeletárními strukturami. Sedmý den pokusu buňky na těchto nosičích vytvořily souvislou vrstvu s množstvím aktinových filament a dobře vyvinutým aktinovým cytoskeletem. Vzorek PVA4 vykazuje tvorbu buněčných agregátů oválných tvarů bez přítomnosti výrazných filopodií, podobně jako PVAN.



Obrázek č. 29 : Vizualizace cytoskeletu melanocytů (Melan-a) na PVA nosičích modifikovaných metanovým plazmatem 7 den kultivace. Jádra buněk modře Hoechst, červeně aktinový cytoskelet Phalloidin, PVA1-6 vzorky s rozdílnou modifikací, PVAN bez modifikace, Obj. x10, zv x4, měřítko 50 μm, imerzní olej.

6 Diskuse

Současný výzkum léčby vitiliga je zaměřen zejména na využití autologních transplantátů, nevýhodou však zůstává absence vhodných nosičů, které by byly schopné udržet transplantované buňky v místě depigmentovaných lézí. Systémem jakési „buněčné náplasti“ je možné zefektivnit chirurgickou léčbu tohoto kožního onemocnění, neboť umožní pokrytí větších ploch lézí a zmenší plochu a tvorbu defektů v místě odběru zdravé dárcovské tkáně. Byly testovány buněčné nosiče z biomateriálů, umožňující *in vitro* kultivaci melanocytů (Duval et al. 2012; Lin et al. 2005; 2006; Redondo et al. 2008), ale využití nanovláken v terapii vitiliga zatím nebylo publikováno, přesto že vlastnosti nanovláken je předurčují k aplikacím v tkáňovém inženýrství. Kromě toho, že svou strukturou a architekturou napodobují ECM, tak také poskytují velký měrný povrch pro buněčnou adhezi. Dalšími výhodami nanovláken je porozita a možnost jejich funkcionalizace bioaktivními látkami. Díky tomu mohou nanovlákná sloužit jako efektivní systém pro kultivaci buněk a doručování léčiv.

Cílem práce bylo navrhnout nanovláknenný nosič, který by umožnil kultivaci a následnou transplantaci melanocytů a keratinocytů. Potřebné jsou oba buněčné typy, protože kontakt s keratinocyty je nezbytný pro růst a normální funkci melanocytů (Shin et al. 2012). Kožní buňky velmi dobře adherují na hydrofilní materiály s nano a mikrostrukturami (Ranella et al. 2010). Proto jsme se rozhodli vyrobit nanovláknenný nosič z PVA polymeru metodou elektrostatického zvlákňování. PVA je polymer schválený pro biomedicínské aplikace, bohužel jeho nevýhodou je přílišná hydrofilita jeho povrchu, která nepodporuje buněčnou adhezi (Buzgo et al. 2015).

V diplomové práci jsem navázala na předchozí výsledky získané v naší laboratoři, kdy byl testován vliv modifikace CH₄ plazmatem na adhezi a proliferaci mezenchymálních kmenových buněk. Jak zmiňuje Bezděková (2013) ve své diplomové práci, při vysokém záporném napětí v reaktoru a delší době působení CH₄ plazmatu se zvětšuje průměr vláken a zároveň se snižuje pórovitost nanovláknenné vrstvy. Tento jev je nežádoucí, neboť se tím snižuje distribuce živin a difuze odpadních látek z oblasti kontaktu nanovláknenné vrstvy s buňkami. Výsledky také naznačili, že výše zmíněná modifikace při hodnotě napětí 300 V a aplikaci plazmatu méně než 5 minut, nemá významný vliv na průměr a morfologii vláken (Bezděková 2013).

Dalším krokem bylo zjistit jaký vliv má nižší míra modifikace CH₄ plazmatem na PVA nanovlákná a jak ovlivňuje adhezi a viabilitu buněk na těchto nosičích. Předpokládali jsme, že jedna z variant úpravy povrchu PVA bude vhodná pro kultivaci epidermálních buněk pro budoucí využití v terapii vitiliga.

Ve spolupráci s Technickou univerzitou v Liberci jsme hydrofilitu PVA nanovláken snížili aplikací studeného CH₄ plazmatu. Předpokládali jsme, že tím docílíme poklesu -OH skupin a depozice hydrofobních uhlovodíkových zbytků, zejména CH₃ skupin na povrch nanovláken. Plazmatická úprava umožňuje umístit funkční skupiny na povrch nejrozličnějších materiálů, avšak výsledné ovlivnění povrchu je závislé na řadě faktorů – chemická struktura ošetřovaného materiálu, doba působení plazmatu, druh plazmatu, tlak aj. Působení plazmatu na materiály se proto nedá unifikovat. Vliv povrchové modifikace CH₄ plazmatem na fyzikálně-chemické vlastnosti PVA nosičů jsme proto hodnotili měřením kontaktního úhlu povrchu, SEM a XPS analýzou.

V rámci této studie jsme podrobili vzorky SEM analýze, která potvrdila, že vláknenná struktura PVA nosičů vyrobených EZ a modifikovaných studeným CH₄ plazmatem po dobu 5 a 2,5 min při napětí 300 V a průtoku plynu od 5-15 sccm zůstává zachována. Dále bylo zjištěno, že jsou-li takto modifikovaná vlákna vystavena okolní atmosféře, dochází u nich k vazbě vzdušné vlhkosti a tím k zvětšování jejich průměru (bobtnání). Nejvíce plazmatem modifikovaný vzorek (PVA1) vykazoval nejvyšší stabilitu a nejnižší míru bobtnání. Změna v povrchovém složení, díky depozici hydrofobních skupin na PVA nanovlákná, zabezpečí snížení míry bobtnání, neboť se omezí nasávání vzdušné vlhkosti z okolní atmosféry. Taktéž jsme sledovali nerovnosti na modifikovaných PVA vláknech, pravděpodobně způsobené nerovnoměrnou depozicí metanu na jejich povrch. Dále lze přisuzovat změnu hrubosti reaktivnímu prostředí v plazmatické komoře, které mírně naleptává materiál působením částic s vysokou energií.

Na základě výsledků SEM analýzy a měření průměru vláken se domníváme, že povrchová úprava materiálu CH₄ plazmatem je dostatečně stabilní a nedochází zde k navrácení změněných vlastností na hodnotu před plazmatickou modifikací, což bylo sledováno u jiných druhů plazmatu (Kowalonek et al. 2010). Do budoucna by bylo zajímavé sledovat změny vlastností povrchu PVA nanovláken v čase a porovnat je s hodnotami změřenými ihned po plazmatické modifikaci.

Změna v chemickém složení a v jevech na rozhraní pevná látka-kapalina-vzduch má zásadní vliv na velikost kontaktního úhlu, respektive na povrchovou energii nanovláken. Ta se popisuje nejčastěji mírou hydrofility/hydrofobity, která je dána kombinací topologie,

morfologie a chemického složení povrchu materiálu. Vzhledem k tomu, že většina biomateriálů má hydrofobní charakter, častěji se v literatuře objevují práce zaměřené na zvýšení hydrofility buněčných nosičů například ošetřením materiálu O_2 plazmatem (Ozcan et al. 2008), nebo směsí CH_4/O_2 plazmatu (Lopez et al. 2009; Tsai et al. 2011). Příkladem využití plazmatu k navýšení obsahu aminových skupin na PVA hydrogelech je aplikace H_2/N_2 plazmatu (Ino et al. 2013). Obecně však není příliš zdokumentován vliv plazmatické úpravy na nanovlákná vyrobená z PVA.

Řetězce PVA polymeru obsahují velké množství hydrofilních hydroxylových ($-OH$) skupin a proto je jeho celkový charakter velmi hydrofilní. To potvrdili i naše výsledky naměřené u nemodifikovaného vzorku PVAN s hodnotou kontaktního úhlu $49,5^\circ$. Při aplikaci CH_4 plazmatu dochází k zhydrofobnění vrstvy PVA, což dokazuje hodnota kontaktního úhlu $75,1^\circ$ naměřená u vzorku PVA6, který byl modifikován nejméně a to po dobu 2,5 min při průtoku plynu 5 sccm. V případě nejvíce modifikovaného vzorku PVA1 (5minut, 15sccm) jsme naměřili hodnotu kontaktního úhlu $129,4^\circ$. Stejného jevu docílil Joeng et al. (2009), který aplikací CH_4 plazmatu zvýšil hydrofobitu hedvábí. Na základě získaných výsledků můžeme tvrdit, že snížení hydrofility povrchu PVA nanovláken aplikací CH_4 plazmatu je vhodná metoda úpravy povrchové energie nanovláken.

XPS analýzou bylo zjištěno, že modifikace nanovláken CH_4 plazmatem má za následek poklesl obsahu kyslíku a nárůst obsahu uhlíku na povrchu PVA nanovláken. S rostoucím průtokem CH_4 do plazmatické komory se snižuje množství C-O vazeb a roste poměr C-C/C-H vazeb na povrchu nosičů. Nemodifikované PVAN obsahovalo 33,69% kyslíku a 62,46% uhlíku. Obsah kyslíku se výrazně snížil již u nejméně modifikovaného vzorku PVA6 na 24,47% a zároveň bylo dosaženo zvýšení obsahu uhlíku téměř o 9%. U nejvíce modifikovaného vzorku (PVA1) klesl obsah kyslíku o třetinu původní hodnoty až na 11,51%, obsah uhlíku vzrostl na 88,49%. XPS analýza odhalila také přítomnost kontaminací v podobě dusíku, fosforu a draslíku na povrchu nosičů. Původ těchto prvků je pravděpodobně v netěsnosti vakuové komory v průběhu plazmování a reakcí radikálů se vzduchem. Přesto že množství dusíku naměřené u vzorků nanovláken bylo velmi nízké, přítomnost NH_2 skupin může mít vliv na růst buněk na studovaném materiálu (Cutiongco et al. 2016).

Jak již bylo zmíněno v úvodu kapitoly, konkrétní působení a výsledky plazmatické modifikace na povrch materiálu nelze přesně predikovat. Při makroskopickém porovnání vzorků jsme sledovali mírné změny ve zbarvení nosiče. Z toho soudíme, že kvalita plazmatická modifikace není stejnoměrná na celé ploše vzorku. Nerovnoměrnost je zřejmě

způsobena nerovností vzorku při aplikaci plazmatu a může vést k rozdílným hodnotám XPS analýzy, kontaktního úhlu a Zeta potenciálu v rámci jednoho vzorku. Přesto výsledky měření Zeta potenciálu korelují s hodnotami XPS analýzy a kontaktního úhlu PVA nosičů.

V rámci této práce bylo také zjištěno, že použitá CH₄ plazmatická modifikace nemá signifikantní vliv na vazbu proteinů na povrch PVA nanovláken. Jako referenční protein jsme zvolili BSA, který je běžně součástí kultivačních médií, ovšem jeho náboj závisí na pH. Je-li rozpuštěn ve vodě (pH 7), má záporný náboj a proto by se měl ve větší míře vázat na vzorky s kladnějšími hodnotami Zeta potenciálu, tedy na nejvíce modifikované metanem. Tento trend však nebyl sledován. Pro další analýzu adheze proteinů na modifikovaná PVA nanovláčka doporučujeme zvolit i jiný modelový protein. Neboť vazba proteinů na buněčný nosič hraje důležitou roli v jejich biokompatibilitě (Bacakova et al. 2011; Kasalkova et al. 2014).

Výsledek buněčných testů *in vitro* prokázali zvýšenou adhezi, metabolickou aktivitu a proliferaci keratinocytů a melanocytů na modifikovaných vzorcích PVA. Nejvyšší míru metabolické aktivity a proliferace vykazovaly buňky na vzorcích PVA3 a PVA6. Použitý MTS test metabolické aktivity může být ovlivněn počtem buněk a mitochondrií v každé z nich. Z důvodu možného zkreslení výsledků MTS testu aktivitou buněk uchycených mimo nosič byly vzorky před analýzou metabolické aktivity přeneseny do nové kultivační destičky. Případné odchylky měření mohly být způsobeny poškozením, či odsátím buněk, při výměně média a přenášení nosičů s buňkami při MTS analýze.

Vzorek PVA4 oproti ostatním nosičům v kultivačním médiu plavalo u hladiny. Tento vzorek se v kultivačních jamkách opakovaně kroutil, což vedlo k nižší a méně homogenní adhezi buněk. Oproti ostatním vzorkům byly vrstvy nanovláken PVA4 slabší, to mohlo být důvodem jeho kroucení a nadnášení ve vodním sloupci v kultivačních jamkách. Řešením tohoto problému by byla výroba tlustších, tedy vícevrstevných PVA nanovláken. Díky tomu by vzorky neplavaly a nekroutili se v kultivačních destičkách. Zároveň by se dosáhlo větší mechanické odolnosti a tuhosti PVA nosičů, což jak popisuje literatura je výhodné pro kultivaci epidermálních buněk (Wang et al. 2012).

V průběhu analýzy proliferace melanocytů jsme zaznamenali pokles fluorescence a současně nárůst obsahu melaninu na stejných vzorcích od 7. do 14. dne. Obsah dsDNA 7. až 14. den kultivace melanocytů byl přesto signifikantně vyšší na vzorcích PVA3, PVA6 a tedy ve shodě s výsledky MTS testu. Z výsledků buněčných testů soudíme, že takto upravené nosiče jsou vhodné pro krátkodobé kultivace, například pro expanzi buněk v terapii vitiliga.

Hodnoty naměřené fluorescence v rámci testu proliferace u melanocytů jsou velmi variabilní v porovnání s hodnotami naměřenými při kultivaci keratinocytů. Domníváme se, že naměřená fluorescence mohla být zkreslena absorpcí části energie v průběhu měření melaninem ve vzorku, protože melanin produkovaný melanocyty také dává signál při stejných vlnových délkách jako dsDNA ($\lambda_{\text{Exc}}=485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=523 \text{ nm}$) (URL4). Řešením tohoto problému je volba jiné metody stanovení obsahu dsDNA, nebo přepočítáním buněk z mikrofotografií během všech experimentálních dnů. Proto jsme proliferaci melanocytů hodnotili z dostupných mikrofotografií, ze kterých jsme spočítali počet buněk na cm^2 . Rozdíl v počtu buněk však nebyl signifikantní z důvodu velkých odchylek měření a nerovnoměrné hustotě buněk na nosičích. Jak již bylo zmíněno, nerovnoměrné rozložení buněk je způsobeno nehomogenní plazmatickou modifikací.

V průběhu experimentu jsme zaznamenali rostoucí obsah melaninu na modifikovaných vzorcích PVA od 7. do 14. dne kultivace. Největší obsah melaninu byl naměřen 14. den kultivace u vzorku PVA3. U vzorků PVA 3 a PVA6 jsme v průběhu celého pokusu sledovali nejvyšší postupný nárůst obsahu melaninu, což vypovídá o stimulaci melanogeneze melanocytů na takto upraveném nosiči. Tyto výsledky doplňují analýzu, adheze, proliferace a metabolické aktivity melanocytů, ve kterých byly vzorky PVA3 a 6 taktéž hodnoceny nejlépe.

Naopak neupravené PVA nosiče nejsou vhodné k adhezi buněk. O tom vypovídají výsledky konfokální mikroskopie, kde jsme první den pokusu sledovali nízkou adhezi vyznačující se malým počtem buněk, často ve shlucích s oválnou morfologií jak u keratinocytů, tak u melanocytů. Modifikace PVA nanovláken vedla ke zvětšení plochy obou typů buněk, přičemž nejlépe buňky adherovaly na nejméně modifikované vzorky s nejnižším použitým průtokem plynu 5 sccm a dobou aplikace 5 a 2,5 minut (PVA3, PVA6). Získaná data podporují již dříve popsání výsledky, kdy ošetření plazmatem vedlo ke zlepšení adheze buněk na nosič (Cheruthazhekatt et al. 2013).

Na analýzu adheze buněk jsme navázaly vizualizací cytoskeletu buněk 7. den experimentu, ve kterém je vidět vliv adheze, proliferace a migrace na tvar buněk. Buňky na modifikovaných vzorcích byl oproti nemodifikované PVA kontrole značně roztažené s výrazně barveným aktinovým cytoskeletem. Značením aktinu phalloidinem konjugovaným s rhodaminem jsme zobrazili morfologii cytoskeletu, filopodia a stresová vlákna. Výsledky naznačují, že modifikace CH_4 plazmatem vede k rozvoji aktinového cytoskeletu, což je důležité jak pro buněčnou adhezi, tak viabilitu a proliferaci buněk. Neboť na aktinový cytoskelet je navázána řada signálních drah a integrinových receptorů řídící buněčný cyklus.

Shrnutím získaných poznatků je, že nanovláknenné nosiče z PVA upravené studeným CH_4 plazmatem, jsou vhodné ke kultivaci keratinocytů a melanocytů. Z toho plyne možnost jejich aplikace v dermatologii, například v terapii vitiliga. Výsledky této práce jsou základem pro další studie vlivu modifikace povrchu CH_4 plazmatem na adhezi a viabilitu buněk, stejně tak i na změnu fyzikálně-chemických vlastností ošetřeného materiálu. Plazmatická úprava povrchu je slibnou metodou pro zlepšení charakteru materiálů používaných ve tkáňovém inženýrství a biomedicině, neboť kombinací řady parametrů plazmatické modifikace lze vytvořit ideální nosič pro kultivaci, adhezi, proliferaci ale také cílenou diferenciaci různých typů buněk.

7 Závěr

Hlavním cílem práce bylo vyvinout nanovláknenný nosič z PVA, který bude vhodný pro kultivaci a autologní transplantaci melanocytů a keratinocytů v terapii vitiliga. Nanovláknena byla vyrobena metodou elektrostatického zvlákňování pomocí strunové elektrody. Připravené nosiče byly modifikovány studeným CH_4 plazmatem s různou dobou působení a mírou průtoku plynu do reaktoru. Tím bylo vytvořeno šest rozdílných skupin.

U modifikovaných vzorků i nemodifikovaných kontrol nanovláknenných PVA nosičů byla provedena fyzikálně-chemická a optická analýza povrchu metodami: SEM, XPS, měřením Zeta potenciálu a smáčivosti povrchu. Modifikace povrchu nanovláken CH_4 plazmatem vedla ke zvýšení obsahu uhlíku a snížení množství kyslíku na povrchu PVA nosičů. Tím byla snížena jak hydrofilita materiálu, tak smáčivost a zvýšeny hodnoty Zeta potenciálu u PVA nanovláken. Navýšení obsahu hydrofobních funkčních skupin ($-\text{CH}_3$) na povrchu nanovláken po modifikaci CH_4 plazmatem, mělo za následek snížení vazby vzdušné vlhkosti a zlepšení stability PVA nosičů. U žádného ze vzorků jsme nezaznamenali porušení základní struktury nanovláken vlivem použité plazmatické modifikace.

Pomocí *in vitro* buněčných testů bylo zjištěno, že krátkodobá modifikace povrchu nosičů z PVA studeným CH_4 plazmatem zlepšuje adhezi, proliferaci a viabilitu melanocytů a keratinocytů. U melanocytů dále zvyšuje metabolickou aktivitu a tím produkci melaninu v porovnání s nemodifikovaným PVA nosičem. Nejlepší výsledky *in vitro* testů byly pozorovány u vzorků PVA3 a PVA6 s modifikací po dobu 5 min/průtokem plynu 5 sccm a 2,5 min/5 sccm při záporném napětí 300 V a tlaku 30 Pa.

Cíle práce byly splněny, neboť se nám podařilo pomocí plazmatické modifikace CH_4 plazmatem upravit fyzikálně-chemické vlastnosti hydrofilních PVA nanovláken. Výsledky práce jsou základem pro optimalizaci vlastností PVA nanovláken pro *in vitro* testování buněčných nosičů nejen pro kožní aplikace. V budoucnu bychom rádi otestovali modifikované nosiče s nejlepší mírou adheze a viability buněk (PVA3 a PVA6) v kokultuře melanocytů a keratinocytů *in vitro*, která by mohla být vhodným modelem pro regeneraci kůže.

8 Seznam literatury

AGARWAL, S., J. H. WENDORFF AND A. GREINER Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*, Dec 2008, 49(26), 5603-5621.

AL-REFU, K. Vitiligo in Children: A Clinical-Epidemiologic Study in Jordan. *Pediatric Dermatology*, Jan-Feb 2012, 29(1), 114-115.

AL-SHOBAILI, H. A. Treatment of Vitiligo Patients by Excimer Laser Improves Patients' Quality of Life. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, Jan-Feb 2015, 19(1), 50-56.

ALGHAMDI, K. M., H. KHURRUM, A. TAIEB AND K. EZZEDINE Treatment of Generalized Vitiligo With Anti-TNF-alpha Agents. *Journal of Drugs in Dermatology*, Apr 2012, 11(4), 534-539.

ALIKHAN, A., L. M. FELSTEN, M. DALY AND V. PETRONIC-ROSIC Vitiligo: A comprehensive overview Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. *Journal of the American Academy of Dermatology*, Sep 2011, 65(3), 473-491.

ALVES, M.-H., B. E. B. JENSEN, A. A. A. SMITH AND A. N. ZELIKIN Poly(Vinyl Alcohol) Physical Hydrogels: New Vista on a Long Serving Biomaterial. *Macromolecular Bioscience*, Oct 10 2011, 11(10), 1293-1313.

ANDREASSI, L., E. PIANIGIANI, A. ANDREASSI, P. TADDEUCCI, et al. A new model of epidermal culture for the surgical treatment of vitiligo. *International Journal of Dermatology*, Aug 1998, 37(8), 595-598.

ASAKAWA, R., S. NAGASHIMA, Y. NAKAMURA, T. HASEBE, et al. Combining polymers with diamond-like carbon (DLC) for highly functionalized materials. *Surface & Coatings Technology*, Nov 2011, 206(4), 676-685.

BACAKOVA, L., E. FILOVA, M. PARIZEK, T. RUMIL, et al. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*, Nov-Dec 2011, 29(6), 739-767.

BECK, A. J., J. PHILLIPS, L. SMITH-THOMAS, R. D. SHORT, et al. Development of a plasma-polymerized surface suitable for the transplantation of keratinocyte-melanocyte cocultures for patients with vitiligo. *Tissue Engineering*, Dec 2003, 9(6), 1123-1131.

BENNETT, D. C., P. J. COOPER AND I. R. HART A line of nontumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B-16 melanoma and requiring a tumor promoter for growth. *International Journal of Cancer*, Mar 15 1987, 39(3), 414-418.

BEZDĚKOVÁ, D. Plazmatická úprava funkcionalizovaných PVA nanovláken za účelem zvýšení adheze, viability a proliferace mezenchymálních kmenových buněk. Charles University in Prague, 2013.

BLACKSTONE, B. N., J. J. WILLARD, C. H. LEE, M. T. NELSON, et al. Plasma surface modification of electrospun fibers for adhesion-based cancer cell sorting. *Integrative Biology*, 2012 2012, 4(9), 1112-1121.

BODUGOZ-SENTURK, H., C. E. MACIAS, J. H. KUNG AND O. K. MURATOGLU Poly(vinyl alcohol)-acrylamide hydrogels as load-bearing cartilage substitute. *Biomaterials*, Feb 2009, 30(4), 589-596.

BOESE, G., C. TRIMPERT, W. ALBRECHT, G. MALSCH, et al. Membranes from acrylonitrile-based polymers for selective cultivation of human keratinocytes. *Tissue Engineering*, Dec 2007, 13(12), 2995-3002.

BRAGHIROLI, D. I., D. STEFFENS AND P. PRANKE Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics. *Drug Discovery Today*, Jun 2014, 19(6), 743-753.

BUZGO, M., J. GREPLOVA, M. SOURAL, D. BEZDEKOVA, et al. PVA immunonanofibers with controlled decay. *Polymer*, Oct 23 2015, 77, 387-398.

BUZGO, M., R. JAKUBOVA, A. MICKOVA, M. RAMPICHOVA, et al. Time-regulated drug delivery system based on coaxially incorporated platelet alpha-granules for biomedical use. *Nanomedicine*, Jul 2013, 8(7), 1137-1154.

CARLIE, G., N. B. A. NTUSI, P. A. HULLEY AND S. H. KIDSON KUYA (kellin plus ultraviolet A) stimulates proliferation and melanogenesis in normal human melanocytes and melanoma cells in vitro. *British Journal of Dermatology*, Oct 2003, 149(4), 707-717.

CHAN, C. M., T. M. KO AND H. HIRAOKA Polymer surface modification by plasmas and photons. *Surface Science Reports*, 1996, 24(1-2), 3-54.

CHAOUAT, M., C. LE VISAGE, W. E. BAILLE, B. ESCOUBET, et al. A Novel Cross-linked Poly(vinyl alcohol) (PVA) for Vascular Grafts. *Advanced Functional Materials*, Oct 9 2008, 18(19), 2855-2861.

CHEN, J.-P., C.-Y. KUO AND W.-L. LEE Thermo-responsive wound dressings by grafting chitosan and poly(N-isopropylacrylamide) to plasma-induced graft polymerization modified non-woven fabrics. *Applied Surface Science*, Dec 1 2012, 262, 95-101.

CHERUTHAZHEKATT, S., M. CERNAK, P. SLAVICEK AND J. HAVEL Gas plasmas and plasma modified materials in medicine. *Journal of Applied Biomedicine*, Jun 2010, 8(2), 55-66.

CHOI, J. S., K. W. LEONG AND H. S. YOO In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF). *Biomaterials*, Feb 2008, 29(5), 587-596.

CHU, P. K., J. Y. CHEN, L. P. WANG AND N. HUANG Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science & Engineering R-Reports*, Mar 29 2002, 36(5-6), 143-206.

CICHOREK, M., M. WACHULSKA, A. STASIEWICZ AND A. TYMINSKA Skin melanocytes: biology and development. *Postępy Dermatologii i Alergologii*, 2013 2013, 30(1), 30-41.

COSTIN, G.-E. AND V. J. HEARING Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *Faseb Journal*, Apr 2007, 21(4), 976-994.

CUTIONGCO, M. F. A., S. H. GOH, R. AID-LAUNAS, C. LE VISAGE, et al. Planar and tubular patterning of micro and nano-topographies on poly(vinyl alcohol) hydrogel for improved endothelial cell responses. *Biomaterials*, Apr 2016, 84, 184-195.

DANIEL, B. S. AND R. WITTAL Vitiligo treatment update. *Australasian Journal of Dermatology*, May 2015, 56(2), 85-92.

DELGADO-RIVERA, R., J. GRIFFIN, C. L. RICUPERO, M. GRUMET, et al. Microscale plasma-initiated patterning of electrospun polymer scaffolds. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, Jun 1 2011, 84(2), 591-596.

DENES, F. S. AND S. MANOLACHE Macromolecular plasma-chemistry: an emerging field of polymer science. *Progress in Polymer Science*, Aug 2004, 29(8), 815-885.

DING, J., S.-C. CHEN, X.-L. WANG AND Y.-Z. WANG Preparation and Rheological Behaviors of Thermoplastic Poly(vinyl alcohol) Modified by Lactic Acid. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, Aug 3 2011, 50(15), 9123-9130.

DRAGAN, A. I., J. R. CASAS-FINET, E. S. BISHOP, R. J. STROUSE, et al. Characterization of PicoGreen Interaction with dsDNA and the Origin of Its Fluorescence Enhancement upon Binding. *Biophysical Journal*, Nov 2010, 99(9), 3010-3019.

DUVAL, C., C. CHAGNOLEAU, F. POURADIER, P. SEXTIUS, et al. Human Skin Model Containing Melanocytes: Essential Role of Keratinocyte Growth Factor for Constitutive Pigmentation-Functional Response to alpha-Melanocyte Stimulating Hormone and Forskolin. *Tissue Engineering Part C-Methods*, Dec 2012, 18(12), 947-957.

ELEFThERiADOU, V., M. E. WHITTON, D. J. GAWKRODGER, J. BATCHELOR, et al. Future research into the treatment of vitiligo: where should our priorities lie? Results of the vitiligo priority setting partnership. *British Journal of Dermatology*, Mar 2011, 164(3), 530-536.

ENOMOTO, K., T. HASEBE, R. ASAKAWA, A. KAMIJO, et al. Controlling the drug release rate from biocompatible polymers with micro-patterned diamond-like carbon (DLC) coating. *Diamond and Related Materials*, Jul-Sep 2010, 19(7-9), 806-813.

ERNFORS, P. Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. *Experimental Cell Research*, May 1 2010, 316(8), 1397-1407.

EVES, P. C., A. J. BECK, A. G. SHARD AND S. MAC NEIL A chemically defined surface for the co-culture of melanocytes and keratinocytes. *Biomaterials*, Dec 2005, 26(34), 7068-7081.

EVES, P. C., N. A. BULLETT, D. HADDOW, A. J. BECK, et al. Simplifying the delivery of melanocytes and keratinocytes for the treatment of vitiligo using a chemically defined carrier dressing. *Journal of Investigative Dermatology*, Jun 2008, 128(6), 1554-1564.

EZZEDINE, K., E. AMAZAN, J. SENESCHAL, M. CARIO-ANDRE, et al. Follicular vitiligo: a new form of vitiligo. *Pigment Cell & Melanoma Research*, Jul 2012a, 25(4).

EZZEDINE, K., V. ELEFThERiADOU, M. WHITTON AND N. VAN GEEL Vitiligo. *Lancet*, Jul 4 2015, 386(9988), 74-84.

EZZEDINE, K., H. W. LIM, T. SUZUKI, I. KATAYAMA, et al. Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell & Melanoma Research*, May 2012b, 25(3), E1-E13.

FAHMY, A., E. A. KAMOUN, R. EL-EISAWY, E. M. EL-FAKHARANY, et al. Poly(vinyl alcohol)-hyaluronic Acid Membranes for Wound Dressing Applications: Synthesis and in vitro Bio-Evaluations. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Jul 2015, 26(7), 1466-1474.

FALABELLA, R. Vitiligo and the melanocyte reservoir. *Indian Journal of Dermatology*, 2009, 54(4):313-318.

FEDOROW, H., F. TRIBL, G. HALLIDAY, A. GERLACH, et al. Neuromelanin in human dopamine neurons: Comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, Feb 2005, 75(2), 109-124.

FELSTEN, L. M., A. ALIKHAN AND V. PETRONIC-ROSIC Vitiligo: A comprehensive overview Part II: Treatment options and approach to treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, Sep 2011, 65(3), 493-514.

GAUTHIER, Y. AND L. BENZEKRI Non-cultured epidermal suspension in vitiligo: From laboratory to clinic. *Indian Journal of Dermatology Venereology & Leprology*, Jan-Feb 2012, 78(1), 59-63.

GHOSH, D., P. KUCHROO, C. VISWANATHAN, S. SACHAN, et al. Efficacy and Safety of Autologous Cultured Melanocytes Delivered on Poly (dl-Lactic Acid) Film: A Prospective, Open-Label, Randomized, Multicenter Study. *Dermatologic Surgery*, Dec 2012, 38(12), 1981-1990.

GIMENEZ-AZCARATE, A., I. BERNAD, I. IRARRAZAVAL, M. LERA, et al. Double-blind, randomized, intraindividually controlled clinical trial to evaluate the efficacy of autologous melanocyte cell transplant using amniotic membrane as a scaffold in the treatment of stable vitiligo. *Journal of the American Academy of Dermatology*, Apr 2013, 68(4), AB189-AB189.

GODING, C. R. Melanocytes: The new Black. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, 39(2), 275-279.

GOH, Y.-F., I. SHAKIR AND R. HUSSAIN Electrospun fibers for tissue engineering, drug delivery, and wound dressing. *Journal of Materials Science*, Apr 2013, 48(8), 3027-3054.

GOONOO, N., A. BHAW-LUXIMON AND D. JHURRY Drug Loading and Release from Electrospun Biodegradable Nanofibers. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, Sep 2014, 10(9), 2173-2199.

GUPTA, D., R. KUMARI AND D. M. THAPPA Depigmentation therapies in vitiligo. *Indian Journal of Dermatology Venereology & Leprology*, Jan-Feb 2012, 78(1), 49-58.

HEARING, V. J. Determination of Melanin Synthetic Pathways 2011, E8–E11.

HEINLIN, J., G. ISBARY, W. STOLZ, G. MORFILL, et al. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, Jan 2011, 25(1), 1-11.

HIROBE, T. Keratinocytes regulate the function of melanocytes. *Dermatologica Sinica*, Dec 2014, 32(4), 200-204.

HOFER, A., H. KERL AND P. WOLF Long-term results in the treatment of vitiligo with oral khellin plus UVA. *European Journal of Dermatology*, May-Jun 2001, 11(3), 225-229.

HOLME, S. A., P. E. BEATTIE AND C. J. FLEMING Cosmetic camouflage advice improves quality of life. *British Journal of Dermatology*, Nov 2002, 147(5), 946-949.

HONG, W. S., D. N. HU, G. P. QIAN, S. A. MCCORMICK, et al. Ratio of size of recipient and donor areas in treatment of vitiligo by autologous cultured melanocyte transplantation. *British Journal of Dermatology*, Sep 2011a, 165(3), 520-525.

HONG, W. S., D. N. HU, G. P. QIAN, S. A. MCCORMICK, et al. Treatment of vitiligo in children and adolescents by autologous cultured pure melanocytes transplantation with comparison of efficacy to results in adults. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, May 2011b, 25(5), 538-543.

HOUBEN, E., K. DE PAEPE AND V. ROGIERS A keratinocyte's course of life. *Skin Pharmacology and Physiology*, 2007, 20(3), 122-132.

HUANG, Q., W. LIANG, D. XU, Y. ZHOU, et al. Ultrastructural observations of human epidermal melanocytes cultured on polyethylene terephthalate film. *Micron*, May 2013, 48, 49-53.

HYON, S. H., W. I. CHA, Y. IKADA, M. KITA, et al. Poly(vinyl alcohol) hydrogels as soft contact-lens material. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 1994 1994, 5(5), 397-406.

INO, J. M., P. CHEVALLIER, D. LETOURNEUR, D. MANTOVANI, et al. Plasma functionalization of poly (vinyl alcohol) hydrogel for cell adhesion enhancement. *Biomatter*, 2013, 3(4), e25414.

JAISWAL, M., A. GUPTA, A. K. AGRAWAL, M. JASSAL, et al. Bi-Layer Composite Dressing of Gelatin Nanofibrous Mat and Poly Vinyl Alcohol Hydrogel for Drug Delivery and Wound Healing Application: In-Vitro and In-Vivo Studies. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, Sep 2013, 9(9), 1495-1508.

JANKOVIC, B., J. PELIPENKO, M. SKARABOT, I. MUSEVIC, et al. The design trend in tissue-engineering scaffolds based on nanomechanical properties of individual electrospun nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics*, Oct 15 2013, 455(1-2), 338-347.

JEONG, L., I.-S. YEO, H. N. KIM, Y. I. YOON, et al. Plasma-treated silk fibroin nanofibers for skin regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, Apr 1 2009, 44(3), 222-228.

JIANG, T., E. J. CARBONE, K. W. H. LO AND C. T. LAURENCIN Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration. *Progress in Polymer Science*, Jul 2015, 46, 1-24.

JIANG, Y., A. SCHAEDELICH, E. AMADO, C. WEIS, et al. In-vivo studies on intraperitoneally administrated poly(vinyl alcohol). *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, Apr 2010, 93B(1), 275-284.

JIMBOW, K., H. CHEN, J. S. PARK AND P. D. THOMAS Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. *British Journal of Dermatology*, Jan 2001, 144(1), 55-65.

JIMBOW, K., W. C. QUEVEDO, T. B. FITZPATRICK AND G. SZABO SOME Aspects of melanin biology - 1950-1975. *Journal of Investigative Dermatology*, 1976, 67(1), 72-89.

JIRSAK, O. AND S. PETRIK Recent advances in nanofibre technology: needleless electrospinning. *International Journal of Nanotechnology*, 2012, 9(8-9), 836-845.

JUNQUEIRA, L. C. U., JOSÉ CARNEIRO A ROBERT O KELLEY *Základy histologie*. Edition ed. Jinočany: H & H, 1997. 45-47, 339-351 p. ISBN 80-85787-37-7.

KAMOUN, E. A., E.-R. S. KENAWY, T. M. TAMER, M. A. EL-MELIGY, et al. Poly (vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: Characterization and bio-evaluation. *Arabian Journal of Chemistry*, Jan 2015, 8(1), 38-47.

KANG, Y. O., I.-S. YOON, S. Y. LEE, D.-D. KIM, et al. Chitosan-Coated Poly(vinyl alcohol) Nanofibers For Wound Dressings. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, Feb 2010, 92B(2), 568-576.

KASALKOVA, N. S., P. SLEPICKA, Z. KOLSKA, P. HODACOVA, et al. Grafting of bovine serum albumin proteins on plasma-modified polymers for potential application in tissue engineering. *Nanoscale Research Letters*, Apr 4 2014, 9.

KASRAEE, B., M. PATAKY, D. S. NIKOLIC, P. CARRAUX, et al. A new spectrophotometric method for simple quantification of melanosomal transfer from melanocytes to keratinocytes. *Experimental Dermatology*, Nov 2011, 20(11), 938-942.

KEMP, E. H., N. G. GAVALAS, D. J. GAWKRODGER AND A. P. WEETMAN Autoantibody responses to melanocytes in the depigmenting skin disease vitiligo. *Autoimmunity Reviews*, Jan 2007, 6(3), 138-142.

KIM, M. J., J. H. KIM, G. YI, S. H. LIM, et al. In vitro and in vivo application of PLGA nanofiber for artificial blood vessel. *Macromolecular Research*, Jun 2008, 16(4), 345-352.

KNOTEK, P., M. POUZAR, M. BUZGO, B. KRIZKOVA, et al. Cryogenic grinding of electrospun poly-epsilon-caprolactone mesh submerged in liquid media. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, Aug 1 2012, 32(6), 1366-1374.

KOBAYASHI, M., Y. S. CHANG AND M. OKA A two year in vivo study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus. *Biomaterials*, Jun 2005, 26(16), 3243-3248.

KOWALONEK, J., H. KACZMAREK AND A. DABROWSKA Air plasma or UV-irradiation applied to surface modification of pectin/poly(vinyl alcohol) blends. *Applied Surface Science*, Oct 15 2010, 257(1), 325-331.

KRUEGER, C. AND K. U. SCHALLREUTER A review of the worldwide prevalence of vitiligo in children/adolescents and adults. *International Journal of Dermatology*, Oct 2012, 51(10), 1206-1212.

KUDRNOVÁ, M., J. PETRŮ, P. SAJDL AND B. BARDA Metoda XPS pro výzkum nanomateriálů. http://konsyst.tanger.cz/files/proceedings/nanocon_09/Lists/Papers/134.pdf, 17.6.2016.

KYLIAN, O., A. CHOUKOUROV AND H. BIEDERMAN Nanostructured plasma polymers. *Thin Solid Films*, Dec 2 2013, 548, 1-17.

LANGER, R. AND J. P. VACANTI Tissue Engineering. *Science*, May 14 1993, 260(5110), 920-926.

LEE, J. H. AND D. E. FISHER Melanocyte stem cells as potential therapeutics in skin disorders. *Expert Opinion on Biological Therapy*, Nov 2014, 14(11), 1569-1579.

LEE, K., K. H. PAEK, W. T. JU AND Y. LEE Sterilization of bacteria, yeast, and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen. *Journal of Microbiology*, Jun 2006, 44(3), 269-275.

LIANG, D., B. S. HSIAO AND B. CHU Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Dec 2007, 59(14), 1392-1412.

LIN, J. S., L. CHEN, Y. LIU AND Y. Z. WANG Flame-retardant and physical properties of poly(vinyl alcohol) chemically modified by diethyl chlorophosphate. *Journal of Applied Polymer Science*, Sep 2012, 125(5), 3517-3523.

LIN, S.-J., W.-C. HSIAO, S.-H. JEE, H.-S. YU, et al. Study on the effects of nylon-chitosan-blended membranes on the spheroid-forming activity of human melanocytes. *Biomaterials*, Oct 2006, 27(29), 5079-5088.

LIN, S. J., S. H. JEE, W. C. HSIAO, S. J. LEE, et al. Formation of melanocyte spheroids on the chitosan-coated surface. *Biomaterials*, Apr 2005, 26(12), 1413-1422.

LIU, B., T. F. ZHANG, B. J. WU, Y. X. LENG, et al. In vitro cytocompatibility evaluation of hydrogenated and unhydrogenated carbon films. *Surface & Coatings Technology*, Nov 2014, 258, 913-920.

LIU, J. B., M. LI, S. YANG, J. P. GUI, et al. Clinical profiles of vitiligo in China: an analysis of 3742 patients. *Clinical and Experimental Dermatology*, Jul 2005, 30(4), 327-331.

LOPEZ, R., R. SANCHIS, D. GARCIA, O. FENOLLAR, et al. Surface characterization of hydrophilic coating obtained by low-pressure CH₄-O₂ plasma treatment on a polypropylene film. *Journal of Applied Polymer Science*, 2009, 111(6), 2992-2997.

LU, P. AND B. DING Applications of Electrospun Fibers. *Recent Patents on Nanotechnology*, Nov 2008, 2(3), 169-182.

LUKAS, D. A DALŠÍ. Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nanoscale technology of the twenty-first century). In.: *Textile Progress*, 2009, vol. Sv.41, stránky 59-140.

LUKAS, D., A. SARKAR AND P. POKORNY Self-organization of jets in electrospinning from free liquid surface: A generalized approach. *Journal of Applied Physics*, Apr 15 2008, 103(8).

LUNA, S. M., S. S. SILVA, M. E. GOMES, J. F. MANO, et al. Cell Adhesion and Proliferation onto Chitosan-based Membranes Treated by Plasma Surface Modification. *Journal of Biomaterials Applications*, Jul 2011, 26(1), 101-116.

MEREDITH, P. AND J. RIESZ Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin. *Photochemistry and Photobiology*, Feb 2004, 79(2), 211-216.

MICKOVA, A., M. BUZGO, O. BENADA, M. RAMPICHOVA, et al. Core/shell nanofibers with embedded liposomes as a drug delivery system. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Oct 2012, 6, 35-35.

MOHAMED, A. AND M. M. XING Polymeric nanofibers in Tissue Engineering. *International journal of burns and trauma*, 2012, 2(1), 29-41.

MORENO, I., V. GONZALEZ-GONZALEZ AND J. ROMERO-GARCIA Control release of lactate dehydrogenase encapsulated in poly (vinyl alcohol) nanofibers via electrospinning. *European Polymer Journal*, Jun 2011, 47(6), 1264-1272.

MOZETIC, M. AND Z. VRATNICA Destruction of *Bacillus stearothermophilus* bacteria by weakly ionized low pressure cold oxygen plasma. *Vacuum*, Jun 5 2011, 85(12), 1080-1082.

MRAD, O., S. SALOUM AND A. AL-MARIRI Effect of a new low pressure SF₆ plasma sterilization system on polymeric devices. *Vacuum*, Feb 2013, 88, 11-16.

MULEKAR, S. V., B. GHWISH, A. AL ISSA AND A. AL EISA Treatment of vitiligo lesions by ReCell (R) vs. conventional melanocyte-keratinocyte transplantation: a pilot study. *British Journal of Dermatology*, Jan 2008, 158(1), 45-49.

MULL, A. N., A. ZOLEKAR AND Y.-C. WANG Understanding Melanocyte Stem Cells for Disease Modeling and Regenerative Medicine Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, Dec 2015, 16(12), 30458-30469.

NAIR, B. AND P. COSMETIC INGREDIENT REVIEW EXPERT Final report on the safety assessment of polyvinyl alcohol. International Journal of Toxicology, 1998, 17, 67-92.

NAKAZAWA, K., F. SAHUC, O. DAMOUR, C. COLLOMBEL, et al. Regulatory effects of heat on normal human melanocyte growth and melanogenesis: Comparative study with UVB. Journal of Investigative Dermatology, Jun 1998, 110(6), 972-977.

NISHIMURA, E. K., S. R. GRANTER AND D. E. FISHER Mechanisms of hair graying: Incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. Science, Feb 4 2005, 307(5710), 720-724.

NJOO, M. D., W. WESTERHOF, J. D. BOS AND P. M. M. BOSSUYT A systematic review of autologous transplantation methods in vitiligo. Archives of Dermatology, Dec 1998, 134(12), 1543-1549.

ONGENAE, K., L. BEELAERT, N. VAN GEEL AND J. M. NAEYAERT Psychosocial effects of vitiligo. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, Jan 2006, 20(1), 1-8.

OSAWA, M., G. EGAWA, S. S. MAK, M. MORIYAMA, et al. Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche. Development, Dec 2005, 132(24), 5589-5599.

OZCAN, C., P. ZORLUTUNA, V. HASIRCI AND N. HASIRCI Influence of oxygen plasma modification on surface free energy of PMMA films and cell attachment. Macromolecular Symposia, 2008, 269, 128-137.

PARADOSSI, G., F. CAVALIERI, E. CHIESSI, C. SPAGNOLI, et al. Poly(vinyl alcohol) as versatile biomaterial for potential biomedical applications. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, Aug 2003, 14(8), 687-691.

PARK, K., Y. M. JU, J. S. SON, K. D. AHN, et al. Surface modification of biodegradable electrospun nanofiber scaffolds and their interaction with fibroblasts. Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 2007, 18(4), 369-382.

PARK, K. K., W. LIAO AND J. E. MURASE A review of monochromatic excimer light in vitiligo. British Journal of Dermatology, Sep 2012, 167(3), 468-478.

PICARDO, M. AND A. TAÏEB *Vitiligo*. Edition ed. Berlin: Springer Science & Business Media, 2010. ISBN 978-3-540-69360-4.

POTSCH, L., P. EMMERICH AND G. SKOPP Preliminary approach to elucidate the role of pigment as a binding site for drugs and chemicals in anagen hairs: pigments as carriers for H-3-haloperidol in HaCaT/Sk-Mel-1 co-cultures. International Journal of Legal Medicine, Feb 2002, 116(1), 12-16.

POWELL, H. M., D. M. SUPP AND S. T. BOYCE Influence of electrospun collagen on wound contraction of engineered skin substitutes. Biomaterials, Mar 2008, 29(7), 834-843.

PUPPI, D., X. ZHANG, L. YANG, F. CHIELLINI, et al. Nano/microfibrous polymeric constructs loaded with bioactive agents and designed for tissue engineering applications: A review. Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials, Oct 2014, 102(7), 1562-1579.

PURI, N., M. MOJAMDAR AND A. RAMAIAH In vitro growth-characteristics of melanocytes obtained from adult normal and vitiligo subjects. Journal of Investigative Dermatology, Apr 1987, 88(4), 434-438.

RAFFAELE-ADDAMO, A., E. SELLI, R. BARNI, C. RICCARDI, et al. Cold plasma-induced modification of the dyeing properties of poly(ethylene terephthalate) fibers. *Applied Surface Science*, Jan 15 2006, 252(6), 2265-2275.

RAO, J. AND R. E. FITZPATRICK Use of the Q-switched 755-nm Alexandrite laser to treat recalcitrant pigment after depigmentation therapy for vitiligo. *Dermatologic Surgery*, Jul 2004, 30(7), 1043-1045.

RAYLEIGH, L. XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 1882, 14(87), 184-186.

REDONDO, P., J. DEL OLMO, M. GARCIA-GUZMAN, L. GUEMBE, et al. Repigmentation of vitiligo by transplantation of autologous melanocyte cells cultured on amniotic membrane. *British Journal of Dermatology*, May 2008, 158(5), 1168-1171.

REDONDO, P., GIM, #XE9, A. NEZ DE AZCARATE, et al. Amniotic Membrane as a Scaffold for Melanocyte Transplantation in Patients with Stable Vitiligo. *Dermatology Research and Practice*, 2011, 6.

REZAEI, N., N. G. GAVALAS, A. P. WEETMAN AND E. H. KEMP Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, Aug 2007, 21(7), 865-876.

RHEINWALD, J. G. AND H. GREEN Formation of keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from teratoma. *Cell*, 1975, 6(3), 317-330.

RICCARDO, D. A., P. FAVIA, Y. KAWAI, H. IKEGAMI, et al. *Advanced plasma technology*. Edition ed.: John Wiley & Sons, 2008. ISBN 3527622195.

RIESZ, J. *The Spectroscopic Properties of Melanin*. University of Queensland, 2007.

RIGON, R. B., M. H. OYAFUSO, A. T. FUJIMURA, M. L. GONCALEZ, et al. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Melanoma Antitumoral Therapy: A Review. *Biomed Research International*, 2015.

RIM, N. G., C. S. SHIN AND H. SHIN Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering. *Biomedical Materials*, Feb 2013, 8(1).

SCHARNAGL, N., S. LEE, B. HIEBL, A. SISSON, et al. Design principles for polymers as substratum for adherent cells. *Journal of Materials Chemistry*, 2010, 20(40), 8789-8802.

SELEIT, I., O. A. BAKRY, A. G. ABDOU AND N. M. DAWOUD Immunohistochemical Study of Melanocyte-Melanocyte Stem Cell lineage in Vitiligo; A Clue to Interfollicular Melanocyte Stem Cell Reservoir. *Ultrastructural Pathology*, May 2014, 38(3), 186-198.

SHIN, Y. H., Y. K. SEO, H. H. YOON, K. Y. SONG, et al. Effect of keratinocytes on regulation of melanogenesis in culture of melanocytes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, Feb 2012, 17(1), 203-210.

SHOBA, E., R. LAKRA, M. S. KIRAN AND P. S. KORRAPATI Design and development of papain-urea loaded PVA nanofibers for wound debridement. *Rsc Advances*, 2014, 4(104), 60209-60215.

SILL, T. J. AND H. A. VON RECUM Electro spinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, May 2008, 29(13), 1989-2006.

SLOW, K. S., L. BRITCHER, S. KUMAR AND H. J. GRIESSER Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization - A review. *Plasma Processes and Polymers*, Aug 2006, 3(6-7), 392-418.

STROBEL, M. AND C. S. LYONS Plasma surface modification of polymers-relevance to adhesion-guest editorial. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 1994, 8(4), 303-304.

SUN, Z. C., E. ZUSSMAN, A. L. YARIN, J. H. WENDORFF, et al. Compound core-shell polymer nanofibers by co-electrospinning. *Advanced Materials*, Nov 17 2003, 15(22), 1929-+.

TARABALLI, F., S. ZANINI, C. LUPO, S. PANSERI, et al. Amino and carboxyl plasma functionalization of collagen films for tissue engineering applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, Mar 2013, 394, 590-597.

TAYLOR, G. Electrically driven jets. *Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences*, 1969, 313(1515), 453-&.

TENDERO, C., C. TIXIER, P. TRISTANT, J. DESMAISON, et al. Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, Jan 2006, 61(1), 2-30.

TOOSSI, P., M. SHAHIDI-DADRAS, M. M. RAD AND R. J. FESHARAKI Non-cultured melanocyte-keratinocyte transplantation for the treatment of vitiligo: a clinical trial in an Iranian population. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, Oct 2011, 25(10), 1182-1186.

TSAI, C. Y., R. S. JUANG AND C. HUANG Surface Modification of Polypropylene Membrane by RF Methane/Oxygen Mixture Plasma Treatment. *Japanese Journal of Applied Physics*, Aug 2011, 50(8).

UYEN, L. D. P., D. H. NGUYEN AND E. K. KIM Mechanism of skin pigmentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, Jul-Aug 2008, 13(4), 383-395.

VASITA, R. AND D. S. KATTI Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, 2006, 1(1), 15-30.

VYSLOUZILOVA, L., J. CHVOJKA AND D. LUKAS Oriented Nanofibrous Layers. *Recent Advances in Textile Composites*, 2010, 187-193.

WANG, Y., G. X. WANG, X. D. LUO, J. H. QIU, et al. Substrate stiffness regulates the proliferation, migration, and differentiation of epidermal cells. *Burns*, May 2012, 38(3), 414-420.

WEBB, K. C., R. TUNG, L. S. WINTERFIELD, A. B. GOTTLIEB, et al. Tumour necrosis factor-alpha inhibition can stabilize disease in progressive vitiligo. *British Journal of Dermatology*, Sep 2015, 173(3), 641-650.

WEI, Q. F., W. D. GAO, D. Y. HOU AND X. Q. WANG Surface modification of polymer nanofibres by plasma treatment. *Applied Surface Science*, May 2005, 245(1-4), 16-20.

XU, L.-C. AND C. A. SIEDLECKI Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials*, Aug 2007, 28(22), 3273-3283.

XU, S., D. DONG, W.-J. WANG, L. FU, et al. Transferable crosslinked chitosan membranes for human melanocyte culture. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Mar 2012, 100A(3), 673-683.

YAGHOobi, R., M. OMIDIAN AND N. BAGHERANI Vitiligo: A review of the published work. Journal of Dermatology, May 2011, 38(5), 419-431.

YAMAGUCHI, Y., V. J. HEARING, A. MAEDA AND A. MORITA NADPH:Quinone Oxidoreductase-1 as a New Regulatory Enzyme That Increases Melanin Synthesis. Journal of Investigative Dermatology, Mar 2010, 130(3), 645-647.

YASUDA, H. AND M. GAZICKI Biomedical application of plasma polymerization and plasma treatment of polymer surfaces. Biomaterials, 1982, 3(2), 68-77.

YOO, H. S., T. G. KIM AND T. G. PARK Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews, Oct 5 2009, 61(12), 1033-1042.

ZHANG, D., W. ZHOU, B. WEI, X. WANG, et al. Carboxyl-modified poly(vinyl alcohol)-crosslinked chitosan hydrogel films for potential wound dressing. Carbohydrate Polymers, Jul 10 2015, 125, 189-199.

ZHANG, W., K. PHILLIPS, A. R. WIELGUS, J. LIU, et al. Neuromelanin Activates Microglia and Induces Degeneration of Dopaminergic Neurons: Implications for Progression of Parkinson's Disease. Neurotoxicity Research, Jan 2011, 19(1), 63-72.

ZHANG, Y., P. C. ZHU AND D. EDGREN Crosslinking reaction of poly(vinyl alcohol) with glyoxal. Journal of Polymer Research, Sep 2010, 17(5), 725-730.

8.1 Internetové zdroje

URL1 Epidermis structure, <https://www.google.es/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjo76r02dvKAhVM7hoKHfyrBeMQjhwIBQ&url=https%3A%2F%2Fwww.pinterest.co%2Fpin%2F58406126394340826%2F&psig=AFQjCNFtpqUIMC2uSIRs3YXynPI878BxXA&ust=1454592612680402>; citováno dne 2.2.2016.

URL2 Vitiligo; <http://tratamientocurativoparaelvitiligo.blogspot.com.es>, citováno dne 4.7.2015.

URL3 Nanofiber Scaffold Technology Validated in a Historic Human Implant, <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biowire/nanofiber-scaffold-technology.html>; Sravya Vajapeyajula, Research Associate and Jed Johnson, Ph.D., Chief Technology Officer of Nanofiber Solutions, Columbus, OH, Biowire Spring 2012, 31–34, citováno dne 6.7.2016

URL4 DAUMAN, J. Absorption spectrum of melanin. In. Cambridge Computer Laboratory, <http://www.cl.cam.ac.uk/~jgd1000/melanin.html>, citováno dne 15.11.2015.